



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Entwicklung einer
Duplex Real Time PCR-Methode
zur gleichzeitigen Bestimmung
von Sesam und Erdnuss in Lebensmitteln

Verfasserin

Sabrina Niedermayer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, November 2009

Studienkennzahl

A 419

(lt. Studienblatt):

Studienrichtung

Diplomstudium Chemie

(lt. Studienblatt):

Betreuerin:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl für die kompetente und sehr freundliche Betreuung bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Ines, Christine, Tazeen und Walter für die tolle Zeit im Labor, die Tipps und das Mut machen, wenn Versuche einmal nicht so funktionieren wollten, bedanken.

Weiters möchte ich mich bei allen Studienkollegen bedanken, mit denen das Lernen um einiges leichter und vor allem auch lustiger war – besonders bei Monika und Florian.

Außerdem möchte ich meiner Familie für ihre Unterstützung danken.

Besondern Dank an Martin, der immer für mich da war und geduldig ein Ohr für meine Sorgen und Probleme hatte und es immer wieder geschafft hat mich von diesen abzulenken.

VIELEN DANK!

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	8
1.1. Nahrungsmittelunverträglichkeiten	8
1.1.1. Definitionen.....	9
1.1.2. Epidemiologie	11
1.1.3. Symptome.....	13
1.1.4. Diagnose.....	13
1.1.5. Therapie.....	15
1.2. Lebensmittelallergene	16
1.2.1. Allgemeines	16
1.2.2. Einfluss der Verarbeitung auf die Allergenität eines Lebensmittels.....	17
1.2.3. Gesetzliche Kennzeichnungspflicht.....	18
1.3. Erdnuss.....	20
1.3.1. Allgemeines	20
1.3.2. Allergie und Allergene.....	21
1.4. Sesam.....	22
1.4.1. Allgemeines	22
1.4.2. Allergie und Allergene.....	22
1.5. Methoden zur Detektion von Lebensmittelallergenen	23
2. ZIELSETZUNG	29
3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	30
3.1. Aufbau der DNA	30
3.2. DNA-Extraktion.....	31
3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.3.1. Die Reaktionskomponenten.....	33
3.3.2. Ablauf der PCR.....	35

3.4.	Real Time PCR	37
3.4.1.	Methoden der Real Time PCR	38
3.4.2.	Auswertung	46
3.5.	Multiplex-Real Time PCR.....	49
3.6.	Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten...	50
3.7.	Photometrie.....	51
4.	ERGEBNISSE	52
4.1.	DNA-Extraktion	52
4.1.1.	DNA-Extraktion von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten	52
4.1.2.	DNA-Extraktion von mit Sesam und Erdnuss gespikten Proben.....	53
4.2.	Entwicklung einer Real Time PCR-Methode zur Detektion von potenziell allergener Erdnuss	56
4.2.1.	Primer und Sonden	56
4.2.2.	Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur	57
4.2.3.	Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer mittels SYBR Green®-Assays	60
4.2.4.	Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration des TaqMan®-Assays.....	64
4.2.5.	Bestimmung der Kreuzreaktivität des TaqMan®-Assays	64
4.2.6.	Erstellen einer Standardkurve und Ermittlung der Effizienz .	65
4.3.	Entwicklung einer Real Time-Duplex-PCR-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Erdnuss.....	66
4.3.1.	Entwicklung des Duplex-Assays	67
4.3.2.	Erstellen von Standardfunktionen und Ermittlung der Effizienz.....	69
4.3.3.	Optimierung des Duplex-Assays	71

4.3.4. Bestimmung der Nachweisgrenze von Erdnuss und Sesam in gespikten Lebensmitteln	80
4.3.4.1. Zwieback.....	81
4.3.4.2. Grissini.....	82
4.3.5. Anwendung des Duplex-Assays auf kommerziell erhältliche Lebensmittel	84
4.3.6. Inhibitionskontrolle	86
5. EXPERIMENTELLES.....	88
5.1. Proben.....	88
5.1.1. Kommerziell erhältliche Lebensmittel	88
5.1.2. Gespikte Lebensmittel	88
5.2. DNA-Isolierung	89
5.2.1. Reagenzien	89
5.2.2. DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode	90
5.2.3. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit	91
5.2.4. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit	91
5.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA.....	93
5.4. Real Time PCR	93
5.4.1. Pipettierschema.....	95
5.4.2. Supermix	95
5.4.3. Mastermix	96
5.4.4. Primer und Sonden.....	96
5.5. Entwicklung des Duplex-Assays zur Bestimmung von Sesam und Erdnuss	97
5.5.1. Optimierung der Erdnuss-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur.....	97
5.5.2. Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer	98

5.5.3.Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration	101
5.5.4.Bestimmung der Kreuzreaktivität des TaqMan®-Assays ...	101
5.5.5.Erstellen einer Standardfunktion und Ermittlung der Effizienz des TaqMan®-Assays	102
5.5.6.Bedingungen des Duplex-Assays.....	102
5.5.7.Erstellen einer Standardfunktion und Ermittlung der Effizienz des Duplex-Assays.....	103
5.5.8.Testen des Duplex-Assays mit Erdnuss-/ Sesam-DNA- Mischungen	104
5.5.9.Optimierung des Duplex-Assays	104
5.6. Bestimmung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays...	107
5.7. Nachweis von Erdnuss und Sesam in kommerziell erhältlichen Proben	107
5.8. Inhibitionskontrolle	108
5.9. Verwendete Chemikalien	109
5.10. Verwendete Geräte.....	110
5.10.1. Allgemein.....	110
5.10.2. PCR und Agarosegelelektrophorese	110
6. ZUSAMMENFASSUNG	112
7. ABSTRACT.....	114
8. ANHANG	116
8.1. Abkürzungen.....	116
8.2. Abbildungsverzeichnis	118
8.3. Tabellenverzeichnis	122
8.4. Literaturverzeichnis.....	124
9. CURRICULUM VITAE	128

1. EINLEITUNG

1.1. Nahrungsmittelunverträglichkeiten

Die European Academy of Allergy and Clinical Immunology veröffentlichte 1995 eine Klassifizierung der Nahrungsmittelunverträglichkeiten nach pathogenetischen Mechanismen (siehe Abb. 1). [Ortolani und Pastorello, 2006]

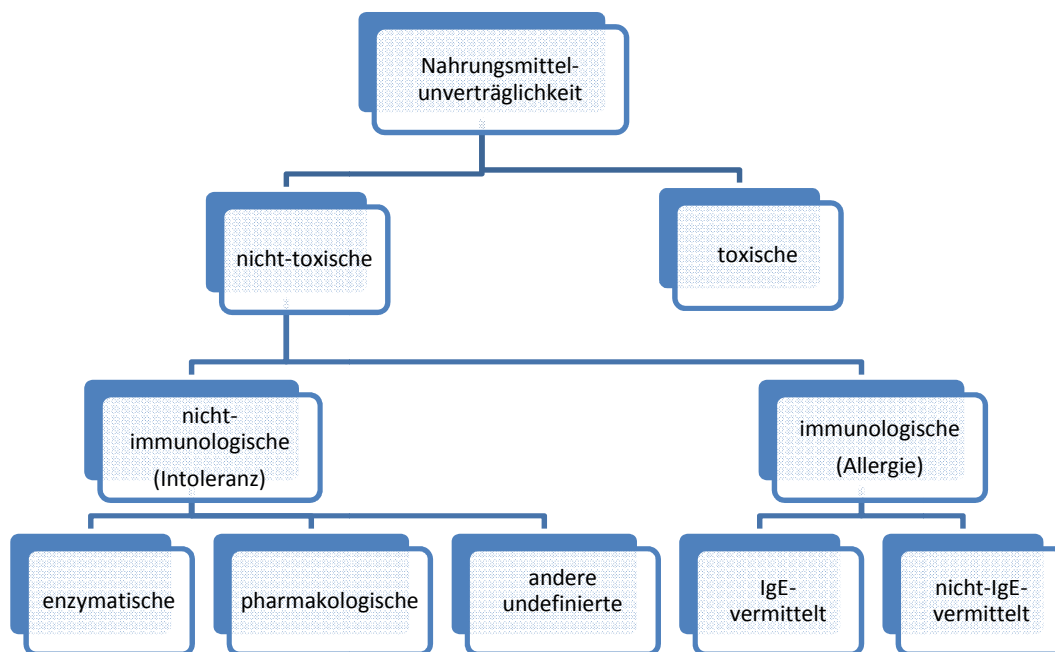


Abbildung 1: Klassifizierung der Nahrungsmittelunverträglichkeitsreaktionen [Ortolani und Pastorello, 2006]

Zunächst wird bei den Unverträglichkeitsreaktionen zwischen toxischen und nicht-toxischen Reaktionen auf Nahrungsmittel bzw. deren Bestandteile unterschieden. Toxische Reaktionen treten bei allen Individuen auf, welche das giftige bzw. das giftige Bestandteile enthaltende Nahrungsmittel zu sich genommen haben. Hingegen treten nicht-toxische Reaktionen nur bei bestimmten Individuen auf, die gewisse Lebensmittel bzw. Bestandteile davon in irgendeiner Art und Weise nicht tolerieren. Hier wird weiters zwischen immunologischen (Allergie) und

nicht-immunologischen Reaktionen (Intoleranz) unterschieden. Immunologische Überempfindlichkeitsreaktionen werden in IgE-vermittelte und nicht-IgE-vermittelte Reaktionen unterteilt, wobei IgE-vermittelte die Mehrheit aller allergischen Reaktionen ausmachen. Bei den Lebensmittelintoleranzen wird zusätzlich noch zwischen enzymatischen (patientenabhängig), pharmakologischen (nahrungsmittelabhängig) und anderen undefinierten Intoleranzen unterschieden. [Ortolani und Pastorello, 2006; Asero et al., 2007]

1.1.1. Definitionen

1. Nahrungsmittelunverträglichkeit

Eine Nahrungsmittelunverträglichkeit ist definiert als jegliche klinisch abnorme Reaktion, die nach dem Verzehr von Lebensmitteln bzw. bestimmten Bestandteilen auftritt. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

2. Lebensmittelallergie

Eine Lebensmittelallergie ist eine Antwort des Immunsystems auf aufgenommene Nahrungsmittel bzw. deren Bestandteile. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

2.1. IgE-vermittelte Allergien

Die IgE-vermittelte Allergie beginnt zunächst mit der Sensibilisierung, wobei schon der einmalige Kontakt mit dem Allergen ausreichen kann. Wenn das Allergen auf Makrophagen bzw. Fresszellen trifft, welche den Körper durchstreifen, wird dieses von ihnen verschlungen und in kleinere Fragmente zerteilt. Diese Fragmente werden dann auf der Zelloberfläche dargeboten und spezielle Helfer-T-Lymphozyten (weiße Blutkörperchen) erkennen und binden sie. Dadurch angeregt, schütten die T-Lymphozyten Interleukin 4 und andere Mediatoren aus, welche wiederum B-Lymphozyten, die ebenfalls das Allergen binden, zur Differenzierung in Antikörper produzierende Plasmazellen bewegen. Zu Beginn sind diese Antikörper vom IgM-Typ, doch im späteren Verlauf wird die Produktion auf IgE umgestellt. Die IgE-Antikörper binden an FcεI-Rezeptoren von

Mastzellen (im Gewebe) und Basophilen (im Blutstrom) und können bei neuerlichem Kontakt mit dem Allergen sofort in Aktion treten. Die Schritte der Sensibilisierung laufen symptomfrei ab. Kommt es jedoch zu einem weiteren Kontakt mit dem Allergen, heftet es sich an die von den Mastzellen gebundenen Antikörper. Sofern es sich an zwei oder mehrere Antikörper anlagert, kommt es schließlich zu einer Quervernetzung, die IgE-Rezeptoren rücken zusammen und aktivieren die Zelle. Die angeregte Zelle schüttet daraufhin Mediatoren (Histamin, Leukotriene, Cytokine und Prostaglandin), welche die allergischen Symptome auf direktem oder indirektem Weg verursachen, aus. Diese Mediatoren führen u.a. zur Erweiterung der Blutgefäße, Kontraktionen der glatten Muskulatur, welche Bronchien und Därme umgeben, und Schleimsekretion. [Burks und Ballmer-Weber, 2006; Lichtenstein, 2001]

2.2. Nicht-IgE-vermittelte Allergien

Nicht-IgE-vermittelte Lebensmittelallergien sind Immunantworten, die von anderen Faktoren beeinflusst oder ausgelöst werden. Dazu gehören zellvermittelte Reaktionen, Reaktionen mit anderen Immunglobulinen, wie IgG, IgM und IgA oder Reaktionen mit Immunkomplexen, die von Lebensmitteln und Lebensmittel-Antikörpern gebildet werden. [Ortolani und Pastorello, 2006]

3. Lebensmittelintoleranz

Eine Lebensmittelintoleranz ist eine abnorme physiologische Antwort, die durch aufgenommene Nahrungsmittel oder Zusatzstoffe hervorgerufen wird. Sie ist nicht immunologischer Natur und kann durch viele Faktoren ausgelöst werden. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

Die enzymatische Intoleranz basiert auf enzymatischen Defekten des Gastrointestinaltraktes. Bekanntestes Beispiel dafür ist die Laktose-Intoleranz. Das Disaccharid Laktose, bestehend aus Glukose und Galaktose, wird mit Hilfe der β -Galaktosidase im Dünndarm hydrolysiert und die beiden Monosaccharide werden resorbiert. Das Fehlen der β -Galaktosidase bewirkt eine unvollständige Hydrolyse der Laktose und das

Disaccharid wird erst im Dickdarm von Bakterien in H_2O , CO_2 und H_2 zerlegt. Diese Fermentation im Dickdarm führt dann zu Beschwerden, wie Blähungen, Bauchschmerzen und Durchfall.

Die pharmakologische Intoleranz wird durch vasoaktive Amine oder andere Substanzen in Nahrungsmitteln, welche zu pharmakologischer Aktivität führen, verursacht. Zu den vasoaktiven Aminen zählen Dopamin, Histamin, Norepinephrin, Phenylethylamin, Serotonin und Tyramin.

Zu den undefinierten Intoleranzen zählen jene Reaktionen, deren Mechanismen noch ungeklärt sind, wie z.B. Reaktionen auf Lebensmittelzusatzstoffe, wie Sulfite, Nitrite, Mononatriumglutamat und einige Farbstoffe. [Ortolani und Pastorello, 2006]

4. Pseudo-Allergie

Pseudo-Allergien sind nicht-immunologische Reaktionen, welche jedoch Symptome von Allergien aufweisen, u.a. können sie zur Freisetzung von Histamin oder anderen Mediatoren führen. Der Begriff der Pseudoallergie ist nicht in der Klassifizierung der European Academy of Allergy and Clinical Immunology enthalten. [Ortolani und Pastorello, 2006]

5. Psychosomatische Reaktionen

Psychosomatische Reaktionen auf Nahrungsmittel werden durch mentale Störungen verursacht und sind ebenfalls nicht in der Liste der European Academy of Allergy and Clinical Immunology enthalten. [Ortolani und Pastorello, 2006]

1.1.2. Epidemiologie

Die Zahl der an Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen leidenden Personen ist schwer einzuschätzen. Die meisten Unverträglichkeitsreaktionen werden durch Intoleranzen verursacht, aber Lebensmittelallergien werden v.a. in Industrieländern immer mehr zu einem ernst zu nehmenden Gesundheitsproblem. [Asero et al., 2007]

Studien zeigen, dass ca. 3% der Erwachsenen sowie 6-8% der Säuglinge und Kinder an Unverträglichkeitsreaktionen leiden. Die subjektive Einschätzung in der Bevölkerung ist noch weit höher. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

Lebensmittelallergien treten bei Kindern v.a. in den ersten drei Lebensjahren auf, bis zu ihrem 10. Lebensjahr sind jedoch bis zu 85% ihrer Allergie wieder entwachsen. [Asero et al., 2007]

Betroffene Kleinkinder leiden überwiegend an Allergien gegen Kuhmilch und Hühnereier. Die Erdnussallergie ist bei Kindern und Erwachsenen gleich häufig verbreitet. [European Food Safety Authority, 2004] Hingegen sind Erwachsene vermehrt gegen Meeresfrüchte, Nüsse und Lebensmittel, die Kreuzallergien mit Pollen aufweisen, allergisch. [Untersmayer und Jensen-Jarolim, 2006].

Nicht nur das Alter, sondern auch die geographische Lage bzw. die daraus resultierenden Essgewohnheiten beeinflussen die Häufigkeit der Allergiearten. Während in den USA, Großbritannien und Skandinavien Erdnüsse und Nüsse hauptverantwortlich für lebensbedrohliche Reaktionen sind, verursachen in Frankreich vor allem Eier und Meeresfrüchte, in der Schweiz Sellerie und in Australien ebenfalls Meeresfrüchte allergische Reaktionen. In Zentral- und Nordeuropa spielen hauptsächlich Lebensmittel eine Rolle, welche eine Kreuzallergie zu Birkenpollen aufweisen. Zu diesen gehören die Rosengewächse, wie Äpfel, Birnen, Kirschen, Pfirsiche und Nektarinen, aber auch Kiwis und Nüsse. In den mediterranen Ländern treten ebenfalls vermehrt Allergien gegen Rosengewächse, v.a. gegen Steinobst, andere Früchte, Nüsse und Gemüse auf. Es lässt sich jedoch hier keine Kreuzallergie zu Birkenpollen assoziieren, sondern ein nicht-spezifisches Lipidtransferprotein wurde hierfür als Hauptallergen ausfindig gemacht. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

1.1.3. Symptome

Die meisten allergischen Reaktionen treten innerhalb von wenigen Minuten nach dem Verzehr des allergenen Nahrungsmittels auf, sie können jedoch auch bis zu einigen Stunden auf sich warten lassen. Die Symptome können sehr unterschiedlich sein und mehrere Organe involvieren. Eines der häufigsten ist das orale Allergiesyndrom, dabei reichen die Symptome von Juckreiz bis zum Anschwellen der Lippen, der Zunge, des Gaumens und des Halses. Die dramatischste allergische Reaktion ist sicherlich die Anaphylaxie mit kardiovaskulären und gastrointestinalen Symptomen, die zu Schock und Herz-Kreislaufstillstand führen kann. [Ring et al., 2001; Asero et al., 2007]

Tabelle 1: Symptome nach EFSA [European Food Safety Authority, 2004]

Haut	
Nesselsucht	
atopische Dermatitis	
Angioödem	
Gastrointestinaltrakt	
orales Allergiesyndrom	Übelkeit
Bauchschmerzen	Erbrechen, Brechreiz
Blähungen	Enteropathien
Durchfall	gastroösophagealer Rückfluss
Verstopfung	Gedeihstörung
Respirationstrakt	
Asthma	Rhinitis
Augen	
Konjunktivitis	tränenende Augen
Zentrales Nervensystem	
Kopfschmerzen	
Verhaltensstörungen, wie Aufmerksamkeitsdefizits-/Hyperaktivitätssyndrom	
generalisierte Symptome	
Anaphylaxie	

1.1.4. Diagnose

Um eine Nahrungsmittelunverträglichkeit zu diagnostizieren, wird zunächst mit einer genauen Anamnese und einer klinischen Untersuchung des Patienten begonnen. Dabei werden wichtige Informationen über Zusammenhänge zwischen der Unverträglichkeitsreaktion, dem

verdächtigten Nahrungsmittel, der Menge des aufgenommenen Nahrungsmittels, der Zeit bis zum Einsetzen der Symptome und der Schwere der Symptome, gewonnen. Oft ist ein Tagebuch dabei sehr hilfreich. In weiterer Folge wird meist, v.a. bei einem chronischen Krankheitsverlauf, eine Eliminierungsdiät durchgeführt. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

Um Patienten auf IgE-vermittelte Lebensmittelallergien zu screenen, wird am häufigsten der sog. Skin-Prick-Test eingesetzt. Dabei wird mit glycerinisierten Lebensmittelextrakten, einer Positivkontrolle (Histamin) und einer Negativkontrolle (Kochsalzlösung) die Haut des Patienten punktiert und die Quaddelbildung beobachtet. Wenn eine Quaddel mindestens 3 mm größer ist als bei der Negativkontrolle, spricht man von einem positiven Testergebnis. [Burks und Ballmer-Weber, 2006] Bei diesem Test kommt es besonders auf die Qualität der Extrakte an und einige kommerziell erhältliche sind weniger empfindlich als frisch hergestellte. Eine Verbesserung bringt der Prick-to-Prick-Test, v.a. bei Obst und Gemüse. Dabei wird zuerst mit einer Nadel in das Lebensmittel gestochen und dann direkt in die Haut des Betroffenen. [Asero et al., 2007]

Auf diesem Weg gewonnene negative Testergebnisse sind zu 95% richtig, positive Ergebnisse können jedoch bis zu 50% falsch-positiv sein. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

Zur Identifizierung spezifischer IgE-Antikörper im Serum stehen verschiedene in vitro Tests, wie RAST (Radioallergosorbent Test), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) und FEIA (Fluoro-Enzyme Immunoassay), zur Verfügung. Sie sind jedoch weniger empfindlich als die Hauttests.

Den letzten Schritt in der Diagnose stellt der orale Provokationstest nach dem „Goldenen Standard“, der DBPCFC (Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge), dar. Dabei wird nach einer Eliminierungsdiät, um die Symptombefreiheit des Patienten zu gewährleisten, unter strenger

Überwachung das verdächtige Lebensmittel verabreicht. [Ring et al., 2001]

1.1.5. Therapie

Für Personen mit Nahrungsmittelunverträglichkeiten gibt es nur eine wirklich effiziente Methode im Umgang mit Lebensmittelallergenen - die strikte Eliminierung des betroffenen Nahrungsmittels aus dem Speiseplan.

Um dies zu ermöglichen, ist ein Aufklärungsgespräch mit dem Patienten und/oder der Familie notwendig, außerdem ist der richtige Umgang mit der Allergie und den Allergenen (v.a. mit Deklarationsangaben auf Nahrungsmitteln), aber auch mit gegebenenfalls zu verabreichenden Medikamenten zu lernen.

Ein Problem können nicht nur die Nahrungsmittelunverträglichkeiten selbst sein, sondern aus der Eliminierung gewisser Nahrungsmittel entstehende Mangelernährung und Essstörungen, v.a. wenn mehrere Nahrungsmittel über einen längeren Zeitraum vermieden werden müssen. [Ortolani und Pastorello, 2006; Burks und Ballmer-Weber, 2006]

Für Patienten, die mit Anaphylaxie reagieren, ist eine Behandlung mit Epinephrin unerlässlich und sollte deshalb stets zur Verfügung stehen.

Einige andere Medikamente, wie Cromoglicinsäure, H₁ und H₂ Antihistaminika, Ketotifin, Corticosteroide und Prostaglandin-Synthetaseinhibitoren finden ebenfalls Anwendung. Sie sind jedoch oft nicht effizient oder sie haben nicht vertretbare Nebenwirkungen.

Des Weiteren gibt es einige Studien zu neuen Immuntherapien, wie die humanisierte anti-IgE monoklonale Antikörper Immuntherapie, die Plasmid-DNA Immuntherapie, die Cytokin-vermittelte Immuntherapie, die immunstimulierende sequenzmodulierte Immuntherapie und einige andere. [Burks und Ballmer-Weber, 2006]

1.2. Lebensmittelallergene

1.2.1. Allgemeines

Allergien sind Reaktionen auf körperfremde Proteine oder Glykoproteine, die ein Molekulargewicht von 5000 bis 70 000 Da aufweisen. Damit ein Protein zum Allergen wird, muss es in größeren Mengen und über eine längere Periode im Umfeld und im Ernährungsplan enthalten sein. Des Weiteren müssen sie eine hohe Stabilität gegenüber Lebensmittelverarbeitungsprozessen und Enzymen, die bei der Verdauung im Gastrointestinaltrakt eine Rolle spielen, aufweisen.

Lebensmittel besitzen selten nur ein potentiell allergenes Protein, sondern weisen meist ein ganzes Repertoire davon auf und sensibilisierte Personen zeigen unterschiedliche IgE-vermittelte Reaktionen auf verschiedene Allergene des gleichen Lebensmittels. Reagieren mehr als 50% der Betroffenen auf dasselbe Allergen eines Lebensmittels, spricht man von Hauptallergenen. Treten Allergien mit geringerer Häufigkeit auf, spricht man von Nebenallergenen. Die Einteilung in Haupt- und Nebenallergen bezieht sich jedoch nicht auf die Schwere der allergischen Symptome der Betroffenen.

Über typische strukturelle Eigenschaften allergener Proteine ist nur wenig bekannt. Man weiß jedoch, dass sowohl T-Zellen als auch B-Zellen an der Immunantwort auf Nahrungsmittel-Antigene beteiligt sind und der Rezeptor der T-Zellen mit kleinen Peptiden wechselwirkt, während bei den B-Zellen die Konformation eines Moleküls eine Rolle spielt.

Die allergen-spezifischen, IgE-bindenden Epitope können entweder linear, d.h. sie werden von der Sequenz des Aminosäurerestes der Peptidkette eines Proteins gebildet, oder konformativ sein, wobei die sekundäre bzw. tertiäre Struktur der Proteine beteiligt ist. Es wird vermutet, dass die Konformation für den Beginn einer Allergie von Bedeutung ist und sich im späteren Verlauf auf kleinere Proteineinheiten ausbreitet. Es ist jedoch nicht möglich, irgendwelche allgemeinen strukturellen oder konformativen

Motive bzw. Sequenzmuster für Allergene anzugeben, da experimentelle Ergebnisse nur darauf hindeuten, dass bestimmte Oberflächenregionen von allergenen Proteinen bei der IgE-Bindung eine Rolle spielen.

Die sphärische Form der allergenen Proteine scheint jedoch allen gemein zu sein. Viele Proteine, die im Zusammenhang mit Lebensmittelallergien identifiziert wurden, gehören zur Familie der PR-Proteine (=Pathogeneses-Related), andere wichtige Allergene zu den Profilinen, aber auch andere Allergene wie Samenspeicherproteine oder Lipidtransferproteine konnten identifiziert werden. [Ring et al, 2001; Untersmayer und Jensen-Jarolim, 2006; Bredehorst und David, 2001; European Food Safety Authority, 2004]

1.2.2. Einfluss der Verarbeitung auf die Allergenität eines Lebensmittels

Die Verarbeitung von Lebensmitteln kann Einfluss auf die Allergenität eines Lebensmittels nehmen. Dabei können sowohl Epitope eines Proteins zerstört als auch neue gebildet werden. Konformative Epitope scheinen dabei anfälliger auf Zerstörung durch die Lebensmittelverarbeitung zu sein als lineare Epitope des gleichen Allergens. Lineare Epitope können eher durch Hydrolysierung, chemisch oder absichtlich durch genetische Mutationen modifiziert werden. [Sathe et al., 2005]

Zum Beispiel zeigen Studien, dass die Allergene Ara h 1 und Ara h 2 durch Rösten der Erdnuss weniger löslich und weniger verdaubar sind, eine höhere IgE-Bindung haben und einer strukturellen Änderung unterworfen sind, was zur Folge hat, dass geröstete Erdnüsse stärker allergen sind als rohe Erdnüsse. Dieses Phänomen wird allerdings nur bei hohen Temperaturen, wenn die sog. Maillard Reaktion induziert wird, beobachtet. Bei Temperaturbehandlungen bis 120 °C kommt es zwar ebenfalls zu konformativen Änderungen, aber ein Einfluss auf die Allergenität wird dabei nicht festgestellt.

Andere Studien zeigen, dass das Rösten von Haselnüssen zu einer Minderung der allergischen Reaktion auf das Allergen Cor a 1.04 führt. [European Food Safety Authority, 2004; Maleki, 2004]

Ob die Allergenität eines Lebensmittels durch dessen Verarbeitung zu oder abnimmt, kann nicht vorhergesagt werden und muss für jedes Allergen individuell untersucht werden.

1.2.3. Gesetzliche Kennzeichnungspflicht

Die Kommission der Europäischen Gemeinschaft erließ „die Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür“. Eine Änderung 2003 führte zu der Richtlinie 2003/89/EG, wobei hier nun auch Lebensmittelallergene und deren verpflichtende Deklaration mit eingeschlossen wurden. Nach weiteren Änderungen 2005 und 2006 wurde die aktuellste Richtlinie 2007/68/EG am 27. November 2007 veröffentlicht. Sie nimmt bestimmte Erzeugnisse der Zutaten von der Liste aus der Etikettierungspflicht heraus, da sie nachweisbar keine Reaktionen bei sensibilisierten Personen verursachen. [Richtlinie, 2000; Richtlinie, 2003; Richtlinie, 2007]

Zu den 14 kennzeichnungspflichtigen Zutaten, samt (nicht-)deklarationspflichtigen Erzeugnissen zählen laut Anhang IIIa aus Richtlinie 2007/68/EG:

- ✓ Glutenthaltige Getreide (d. h. Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder deren Hybridstämme) und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) Glukosesirupe auf Weizenbasis einschließlich Dextrose;
 - b) Maltodextrine auf Weizenbasis;
 - c) Glukosesirupe auf Gerstenbasis;
 - d) Getreide zur Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke.
- ✓ Krebstiere und daraus gewonnene Erzeugnisse.

- ✓ Eier und daraus gewonnene Erzeugnisse.
- ✓ Fische und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) Fischgelatine, die als Träger für Vitamin- oder Karotinoidzubereitungen verwendet wird;
 - b) Fischgelatine oder Hausenblase, die als Klärhilfsmittel in Bier und Wein verwendet wird.
- ✓ Erdnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse.
- ✓ Sojabohnen und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) vollständig raffiniertes Sojabohnenöl und -fett;
 - b) natürliche gemischte Tocopherole (E306), natürliches D-alpha-Tocopherol, natürliches D-alpha-Tocopherolazetat, natürliches D-alpha-Tocopherolsukzinat aus Sojabohnenquellen;
 - c) aus pflanzlichen Ölen aus Sojabohnen gewonnene Phytosterine und Phytosterinester;
 - d) aus Pflanzenölsterinen gewonnene Phytostanolester aus Sojabohnenquellen.
- ✓ Milch und daraus gewonnene Erzeugnisse (einschließlich Laktose), außer
 - a) Molke zur Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke;
 - b) Lactit.
- ✓ Schalenfrüchte, d. h. Mandeln (*Amygdalus communis* L.), Haselnüsse (*Corylus avellana*), Walnüsse (*Juglans regia*), Kaschunüsse (*Anacardium occidentale*), Pekannüsse (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), Paranüsse (*Bertholletia excelsa*), Pistazien (*Pistacia vera*), Makadamianüsse und Queenslandnüsse (*Macadamia ternifolia*) und daraus gewonnene Erzeugnisse, außer
 - a) Schalenfrüchte für die Herstellung von Destillaten oder Ethylalkohol landwirtschaftlichen Ursprungs für Spirituosen und andere alkoholische Getränke.
- ✓ Sellerie und daraus gewonnene Erzeugnisse.
- ✓ Senf und daraus gewonnene Erzeugnisse.
- ✓ Sesamsamen und daraus gewonnene Erzeugnisse.

- ✓ Schwefeldioxid und Sulphite in Konzentrationen von mehr als 10 mg/kg oder 10 mg/l, ausgedrückt als SO₂.
- ✓ Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse.
- ✓ Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse.

1.3. Erdnuss

1.3.1. Allgemeines

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) gehört zur Ordnung der Fabales und zur Familie der Fabaceae (Hülsenfrüchtler) bzw. Unterfamilie der Papilionoideae.

Die Erdnuss wird schon seit über 5000 Jahren kultiviert und findet ihren Ursprung in Bolivien. Durch Sklavenhandel gelangte sie nach Afrika und die Spanier brachten sie auch nach Indonesien. Bald darauf wurde die Erdnuss in China, Indien und den USA kultiviert. Heute hat die Erdnuss weltweit große Bedeutung.

Die Frucht einer Erdnuss besteht aus den Samen, die von einer dünnen, rötlichen Samenschale (Testa) umschlossen werden. Zwischen zwei und vier Samen sind zusammen von einer weiteren Hülle (Mesokarp) umschlossen. Diese Hülle bleibt, anders als bei anderen Hülsenfrüchten, geschlossen, weshalb die Erdnuss morphologisch zu den Nüssen gezählt wird.

Die Erdnuss besteht zu 48% aus Fett, 23-27% aus Proteinen und ca. 8% aus Kohlenhydraten.

Die Samen der Erdnuss werden geröstet und gesalzen verzehrt und außerdem ist das Erdnussöl ein sehr beliebtes Speiseöl. Die Amerikaner und Engländer verarbeiten die Erdnusssamen am liebsten zu Erdnussbutter. Eine weitere Anwendung findet die Erdnussmilch als Kuhmilchersatz und Proteinlieferant. [European Food Safety Authority, 2004; Lieberei und Reisdorff, 2007]

1.3.2. Allergie und Allergene

Die Erdnuss-Allergie ist eine der verbreitetsten IgE-vermittelten Reaktionen und der häufigste Auslöser fataler Anaphylaxie.

Sie ist vor allem in Großbritannien und den USA verbreitet und beginnt meist in der Kindheit. Eine Erdnuss-Allergie wird vorwiegend von atopischen Personen entwickelt, die meist an weiteren Lebensmittelallergien (Milch, Ei, Nüsse etc.) leiden. Im Vergleich zu Milch- und Ei-Allergie „entwachsen“ hier die Betroffenen ihrer Allergie jedoch meist nicht. Sie bleibt oft ein lebenslanges Problem und kann an Stärke gewinnen. Obwohl die Erdnuss kreuzreagierende Proteine mit anderen Leguminosen teilt, sind Kreuzallergien kaum verbreitet.

Die allergischen Reaktionen beginnen meist einige Minuten nach dem Verzehr, wobei schon geringe Mengen von 100 µg bis 1 g des Erdnuss-Proteins ausreichen. Die Symptome können sehr leicht, schwer und sogar lebensbedrohlich sein.

Die Erdnuss-Allergene sind Samenspeicherproteine und gehören zwei Hauptglobulinfamilien an: Arachin und Conarachin.

Bis jetzt wurden die beiden Hauptallergene Ara h 1 und Ara h 2, sowie Ara h 3 und Ara h 4, welche zu den Glycinproteinen zählen, Ara h 6 und Ara h 7, welche zu den Conglutin-homologen Proteinen gehören, und auch das Panallergen Profilin Ara h 5 entdeckt und identifiziert. Oleosin, ein lipophiles und thermostabiles Allergen, das in Nüssen und Ölsaaten vorkommt, sowie Agglutinin sind identifiziert, jedoch noch nicht in der Allergen-Datenbank aufgenommen worden.

Zur Detektion von Erdnuss-Allergenen wurden bereits verschiedene analytische Methoden entwickelt: Immuno-Blotting, Rocket Immuno-Elektrophorese (RIE), Radio-Immunoassay (RIA), Radioallergosorbent Assay (RAST), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und die Polymerasekettenreaktion (PCR). [European Food Safety Authority, 2004; Informall database, 2006; Poms et al., 2004]

1.4. Sesam

1.4.1. Allgemeines

Der Sesam (*Sesamum indicum*) gehört zu der Ordnung der Lamiales und der Familie der Pedaliaceae.

Die Kultivierung des Sesams findet ihren Ursprung in den Ländern rund um den Indischen Ozean und Ostafrika. Die Hauptanbaugebiete sind Indien, China und Myanmar.

Von der Sesampflanze werden nur die beigen bis dunkelbraunen Samen genützt. Die Samen besitzen einen Fettanteil von 48-53%, einen Proteinanteil von 15-22% und einen Kohlenhydratanteil von ca. 10%.

Durch die hohe biologische Eiweißwertigkeit des Sesams wird er oft in mit Lysin angereicherter Form bei Eiweißmangel, z.B. in Entwicklungsländern, verwendet. Ein weiterer positiver Aspekt ist der hohe Eisengehalt des Sesams.

Der Sesam findet in Backwaren, Salatdressings, vegetarischem und glutenfreiem Essen sowie als Sesampaste und Sesamöl Verwendung. [European Food Safety Authority, 2004; Poms et al., 2004; Lieberei und Reisdorff, 2007]

1.4.2. Allergie und Allergene

Früher war die Sesam-Allergie nur in Israel und anderen östlichen Ländern ein ernst zunehmendes Gesundheitsproblem. Jede dritte IgE-vermittelte Lebensmittelallergie und jeder zweite anaphylaktische Schock wird in Israel und anderen östlichen Ländern durch Sesam verursacht.

Durch die vermehrte Verwendung von Sesam und Sesamöl, v.a. in glutenfreien und vegetarischen Lebensmitteln, tritt sie jedoch auch vermehrt in anderen europäischen Ländern, den USA und Australien auf.

Die Allergie beginnt oft in der frühen Kindheit, da Sesam gerne als Protein- und Eisenlieferant in der Babynahrung Verwendung findet.

Bereits 30 mg bis 10 g des Sesams bzw. 1-5 ml Sesamöl können Reaktionen bei sensibilisierten Personen auslösen.

Sesam besteht zu ca. 50% aus Öl und zu ca. 20% aus Proteinen, wovon 60-70% zu den wasserunlöslichen 11S-Globulinen und ca. 25% zu den wasserlöslichen 2S-Albuminen gehören. Ses i 1 und Ses i 2 sind die beiden Hauptallergene und gehören zu den 2S-Albuminen. Ses i 1 weist eine 40%ige Homologie mit Allergenen der Sonnenblume, der Paranuss und des Rizinussamen auf. Ein weiteres Allergen ist das Ses i 3. Es gehört zu den 7S-Vicilinen und besitzt eine 41%ige Homologie zum Walnuss-Allergen Jug r 2 und eine 36%ige Homologie zum Erdnuss-Allergen Ara h 1. Die Allergene Ses i 4 und Ses i 5 sind Oleosine, welche eine 75%ige Homologie zu Perilla-Oleosinen (Sesamblatt oder auch Shiso) und eine 56%ige zu Karotten-Oleosinen aufweisen. 2007 wurden die 11S-Globuline Ses i 6 und Ses i 7 als weitere Allergene identifiziert.

Einige Kreuzallergien mit Nüssen und Leguminosen, v.a. mit Sojabohnen und Erdnüssen, sind bekannt.

Zur Detektion von Sesamspuren in Lebensmitteln sind nur einige Methoden entwickelt worden, u.a. ELISAs und PCR-Methoden. [European Food Safety Authority, 2004; Poms et al., 2004; Dalal et al., 2002; Leduc et al., 2006; Beyer et al., 2007]

1.5. Methoden zur Detektion von Lebensmittelallergenen

Zur Detektion und Identifizierung von Lebensmittelallergenen stehen eine ganze Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Wichtig für eine Methode ist eine ausreichende Empfindlichkeit (für Lebensmittelallergene sollte die Nachweisgrenze 1-100 mg/kg betragen), eine hohe Spezifität und eine schnelle und leichte Anwendung. [Krska et al., 2004]

Im Anschluss werden einige ausgewählte analytische Verfahren beschrieben.

➤ Radioallergosorbent Assay und Enzymeallergosorbent Assay

Der Radioallergosorbent Assay (RAST) und der Enzymeallergosorbent Assay (EAST) sind kompetitive Immunoassays, die auf der Detektion von allergen-spezifischem IgE im menschlichen Serum basieren. Dabei binden die spezifischen IgEs des Serums an das Allergen, welches auf einer festen Phase immobilisiert vorliegt. Allergene befinden sich auch in der Probelösung und inhibieren die Bindung zwischen IgE und den immobilisierten Antigenen. Ein zweiter Antikörper, gerichtet gegen die IgEs, wird entweder mit einem Radioisotop (z.B. ^{125}I) oder einem Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase), welches die Farbe eines Substrats ändert, markiert. Die Detektion erfolgt dann entweder mittels Gammazähler (RAST) oder Photometer (EAST). [Besler, 2001; Poms et al., 2004]

➤ Immuno-Blotting

Bei der SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat PolyAcrylamid-Gel-Elektrophorese) werden Allergene anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt, und ihre Identifizierung erfolgt durch anschließendes Immuno-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran und Detektion mittels radio- oder enzymmarkierter Antikörper. Diese Methode wird vor allem mit menschlichen IgE-Antikörpern zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Allergene eingesetzt. [Besler, 2001; Poms et al., 2004]

➤ Rocket-Immunoelktrophorese

Die Rocket-Immunoelktrophorese arbeitet mit einem Antikörper enthaltenden Gel. Die Allergene wandern entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität durch dieses Gel, bis sie auf die Antikörper treffen, mit denen sie schließlich Antikörper-Antigen-Komplexe eingehen und bei einem konstanten Antigen/Antikörperverhältnis bilden sie sog. „Raketen“ aus. Die Höhe der „Raketen“ ist proportional zur Menge der Antigene. [Besler, 2001; Poms et al., 2004]

➤ Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Für die Detektion von Lebensmittelallergenen stehen zwei Arten von Enzyme-Linked Immunosorbent Assays zur Verfügung – der Sandwich-ELISA und der kompetitive ELISA.

Beim Sandwich ELISA wird auf einer festen Oberfläche (wie z.B. einer Mikrotiterplatte) ein spezifischer Antikörper immobilisiert, danach wird die Antigen enthaltende Probe zugegeben und die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung findet statt. Im Anschluss wird ein weiterer Antikörper zugegeben, der gegen das gleiche Antigen gerichtet und mit einem Enzym markiert ist. Danach wird ein Substrat zugesetzt, welches mit dem Enzym reagiert und dadurch seine Farbe ändert. Die dann gemessene Extinktion ist direkt proportional zu der Allergenkonzentration.

Im Unterschied zum Sandwich-ELISA wird beim kompetitiven ELISA, der v.a. zum Nachweis sehr kleiner Proteine dient, das Antigen auf der festen Phase immobilisiert. Die Probelösung, die ebenfalls das Antigen enthält, wird mit dem enzymmarkierten Antikörper inkubiert und im Anschluss auf die Platte aufgetragen. Die immobilisierten Antigene konkurrieren mit den Probenantigenen um die Antikörper. Sind in der Probelösung keine Antigene enthalten, wird der enzymmarkierte Antikörper maximal von den immobilisierten Antigenen gebunden. Die gemessene Extinktion ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in der Probelösung. [Besler, 2001; Poms et al., 2004]

➤ Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real Time PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion werden bestimmte DNA-Fragmente der Gene, die für die Allergene codieren, amplifiziert und detektiert. [Besler, 2001] Die detaillierte Beschreibung der Methode befindet sich in Kap. 3.3.

➤ Biosensoren

Mit Hilfe von Biosensoren können sowohl Allergene als auch spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Dabei wird ein Antikörper oder ein einzelsträngiges DNA-Fragment auf der Oberfläche eines Sensorchips

immobilisiert und die spezifische molekulare Wechselwirkung kann quantitativ, z.B. über den Brechungsindex bestimmt werden. [Poms et al., 2004]

Am häufigsten finden die PCR und der ELISA Anwendung bei der Detektion von Lebensmittelallergenen. Im Folgenden werden einige ausgewählte Publikationen, die sich mit dem Nachweis von Erdnuss- und Sesam-Allergenen beschäftigt haben, beschrieben.

- Schöringhumer und Cichna-Markl (2007) entwickelten eine Real Time PCR-Methode zum Nachweis von Sesam in Lebensmitteln. Für die Detektion wurde das Gen, welches für das Hauptallergen Ses i 1 codiert, herangezogen und als Sonde wurde eine Molecular Beacon-Sonde, die mit dem Fluorophor FAM und dem Quencher DABCYL markiert wurde, eingesetzt. Eine Kreuzreaktivität mit 17 Lebensmitteln, wie Erdnüssen, Sojabohnen, Weizen, Kartoffeln etc. konnte ausgeschlossen werden. Die Amplifikationseffizienz, bestimmt durch eine Verdünnungsreihe des reinen Sesamextraktes von 1:1 bis 1:100000, betrug 100,3%. Es konnte eine absolute Menge von 50 pg Sesam-DNA nachgewiesen werden. Die Amplifikationseffizienz in mit Sesam gespickten Knäckebrötchenproben (Spikelevel von 2,5%-0,001%) betrug 86,4%. [Schöringhumer und Cichna-Markl, 2007]
- Brzezinski (2007) publizierte eine Real Time PCR-Methode zum Nachweis von Sesam. Es wurde ein Fragment des 2S Albumin (Ses i 1) Gens amplifiziert und zur Detektion wurde eine TaqMan®-Sonde eingesetzt. Die Methode zeigte keine Kreuzreaktivität mit anderen Samen, Nüssen und Erdnüssen. Es konnten bis zu 5 pg reine Sesam-DNA nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze wurde in mit Sesam gespickten Weizen Crackern bestimmt und betrug 50 mg/kg. [Brzezinski, 2007]
- Schöringhumer et al. (2009) veröffentlichten die Entwicklung und Validierung einer Duplex-Real Time PCR-Methode zum gleichzeitigen Nachweis von Sesam und Haselnuss in

Lebensmitteln. Die Primer wurden für die Gene, welche für die Allergene Ses i 1 (Sesam) und Cor a 1 (Haselnuss) codieren, entwickelt. Für die Detektion beider Allergene wurden TaqMan®-Sonden verwendet, wobei die für Sesam mit dem Fluorophor FAM und dem Quencher BHQ1 und die für die Haselnuss mit Cy5 und BHQ2 markiert war. Eine Kreuzreaktivität mit 16 häufig in Sesam- und Haselnussprodukten vorkommenden Nüssen und anderen Zutaten konnte für beide ausgeschlossen werden. Die Amplifikationseffizienz in seriell verdünnter DNA (jeweils 1:1 bis 1:100000) betrug 106,7% für Sesam und 98,0% für Haselnuss. Beide konnten in einer absoluten Menge von 50 pg DNA nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für Sesam und Haselnuss wurde anhand von gespikten Keksen bestimmt, sie betrug für beide 50 ppm. [Schöringhumer et al., 2009]

- Scaravelli et al. (2008) erarbeiteten drei Real Time PCR-Methoden, basierend auf dem TaqMan®-Mechanismus, zum Nachweis von Erdnüssen in Lebensmitteln. Zur Entwicklung wurde das Allergen Ara h 3 herangezogen. 32 getestete Lebensmittel, wie Nüsse, Samen, Leguminosen etc. wurden negativ und 5 verschiedene Arten von Erdnüssen wurden positiv getestet. Mit den entwickelten Methoden konnten 2,5 pg reine Erdnuss-DNA und 10 mg/kg Erdnuss in einem Modelllebensmittel detektiert werden. Des Weiteren wurde der Einfluss von 15 unterschiedlichen Extraktionsverfahren auf die Güte der PCR-Methoden untersucht, dabei erwies sich ein kommerziell erhältlicher Kit (Guan Hydr. Wizard® DNA Clean up system (2 g), Promega Co.) als am besten geeignet. [Scaravelli et al., 2008]
- Hird et al. (2003) entwickelten eine Real Time PCR-Methode zur Detektion des Gens, welches für das Allergen Ara h 2 codiert, unter Verwendung einer TaqMan®-Sonde. Die Methode zeigte keine Kreuzreaktivität mit 33 anderen Lebensmitteln, wie z. B. Nüssen, Leguminosen, Tomate, Kartoffel, Schweinefleisch, Huhn, Hase etc. Der Erdnuss-DNA-Extrakt konnte bis zu einer Verdünnung von

1:100000 detektiert werden, wobei sich der lineare Bereich bis zu einer Verdünnung von 1:10000 erstreckte. In einem mit geröstetem Erdnusspulver gespikten Biskuit konnten bis zu 2 ppm Erdnuss nachgewiesen werden. [Hird et al., 2003]

- Stephan und Vieths (2004) veröffentlichten eine Real Time PCR-Methode und einen Sandwich-ELISA zur Detektion von Erdnüssen in Lebensmitteln. Für die PCR wurden das Gen, welches für das Allergen Ara h 2 codiert, und der TaqMan®-Mechanismus herangezogen. Beide Methoden zeigten keine Kreuzreaktivität mit 22 getesteten Lebensmitteln, wie Getreide, Nüsse und Leguminosen. Die Nachweisgrenze für Erdnuss in verarbeiteten Lebensmitteln betrug <10 ppm. Des Weiteren wurden 33 gängige Lebensmittelprodukte zum Vergleich von PCR und ELISA sowie zur Bestimmung von Erdnuss-Kontaminationen in den Produkten getestet. Mit der PCR wurden 3, mit dem ELISA 2 Proben positiv getestet, obwohl Erdnuss nicht in ihrer Zutatenliste enthalten war. [Stephan und Vieths, 2004]

2. ZIELSETZUNG

Die zunehmende Verbreitung von Lebensmittelallergien wird vor allem in Industrieländern immer mehr zu einem ernsthaften Gesundheitsproblem. Schon kleinste Mengen führen bei sensibilisierten Personen zu unerwünschten Reaktionen. Ein Allergiker kann nur durch strikte Vermeidung der betreffenden Lebensmittel symptomfrei bleiben und gerade versteckte bzw. unzureichend gekennzeichnete Lebensmittel stellen daher ein Problem dar.

Sesam (*Sesamum indicum*) und Erdnuss (*Arachis hypogaea*) wurden in den EU-Richtlinien in die Liste der 14 deklarationspflichtigen Lebensmittelzutaten aufgenommen. Sowohl Sesam als auch Erdnuss können zu schweren allergischen Reaktionen, bis hin zum anaphylaktischen Schock führen.

Es ist daher wichtig, zur Überprüfung der richtigen Kennzeichnung bzw. zur Identifikation versteckter Allergene zuverlässige und empfindliche Methoden zu entwickeln.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine Duplex Real Time PCR-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Erdnuss in Lebensmittelproben zu entwickeln und zu validieren. Dazu sollte eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Real Time PCR-Methode zur Detektion von Sesam mit einer in dieser Arbeit neu entwickelten PCR-Methode zur Detektion von Erdnuss kombiniert werden.

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1. Aufbau der DNA

Die DNA besteht aus 2 langen Polynukleotidketten, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten werden und eine Doppelhelix ausbilden. Die einzelnen Nukleotide bestehen aus dem Zucker Desoxyribose mit einer anhängenden Phosphatgruppe und jeweils einer der vier stickstoffhaltigen Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Die Nukleotide sind durch den Zucker und die Phosphatgruppe kovalent aneinander gebunden (=Zuckerphosphatrückgrat).

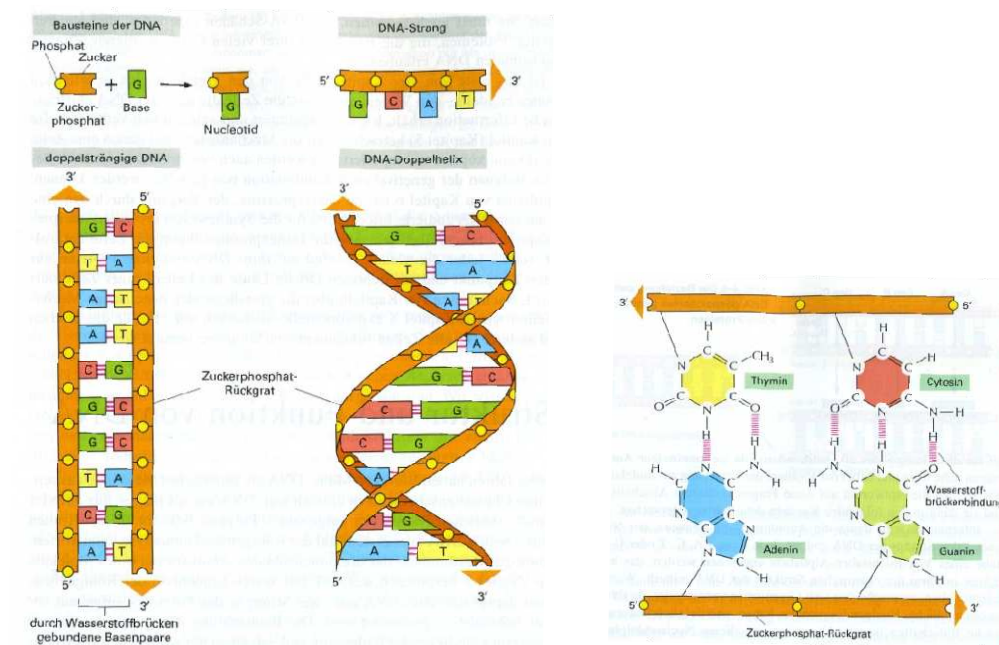


Abbildung 2: Aufbau der DNA [Alberts et al., 2004]

Die Struktur der Doppelhelix wird durch die Eigenschaften der Polynukleotidketten bestimmt. An ihrer Außenseite befindet sich das Zuckerphosphatrückgrat und im Inneren die Basen, welche durch komplementäre Basenpaarung aneinander binden. Es bindet immer eine 2-Ring-Base mit einer 1-Ring-Base zur energetisch günstigsten Packung, wobei A nur mit T und C nur mit G Wasserstoffbrückenbindungen eingeht.

Die komplementäre Basenpaarung führt dazu, dass die Sequenz jedes Stranges gleichzeitig seinen komplementären Strang bestimmt und daher als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dienen kann. Dies führt dazu, dass eine exakte Kopie der Doppelhelix herstellbar ist. Auf diese Art kann die genetische Information kopiert, repliziert und bei der Zellteilung von einer Zelle an ihre Tochterzellen weitergegeben werden. Die von der DNA gespeicherte genetische Information codiert für sämtliche Proteine, die ein Lebewesen im Laufe seines Lebens synthetisiert. [Alberts et al., 2004]

3.2. DNA-Extraktion

Der Erfolg der PCR und anderer molekularbiologischer Methoden wird maßgeblich von der Güte der extrahierten DNA beeinflusst, welche von drei Faktoren bestimmt wird.

- ✓ DNA-Konzentration bzw. Menge
- ✓ Reinheit der isolierten DNA
- ✓ DNA muss intakt sein und darf nicht denaturiert sein

Die Wahl des richtigen Extraktionsverfahrens kann diese Faktoren bedeutend beeinflussen.

Dabei laufen bei einer DNA-Extraktion üblicherweise folgende Schritte ab:

(1) Probenvorbereitung

Um die Richtigkeit des Analysenergebnisses zu gewährleisten, muss darauf geachtet werden, dass die Probe sowohl bezüglich der Matrix als auch bezüglich des Analyten selbst repräsentativ ist. Die Proben müssen daher hinreichend mit z.B. einem Mixer oder Mörser homogenisiert werden. Bereits hier ist darauf zu achten, dass keine Kontaminationen auftreten und die weitere Analyse nicht beeinflusst wird.

(2) Zell- und Membranlysis

In diesem Schritt werden Zellwände und Membranen der Zellorganelle chemisch, mechanisch, enzymatisch, durch Mikrowellen, Ultraschall, Wärme- oder Kältebehandlungen zerstört und so die DNA freigesetzt.

Häufig wird Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Detergens verwendet. Es löst Membranen auf und bildet mit der DNA einen Komplex.

Des Weiteren werden Enzyme wie z.B. Proteinase K, die die DNA von anhaftenden Proteinen befreit, oder auch RNase benötigt.

(3) Schutz und Stabilisierung der DNA

Damit die DNA in ihrer neuen Umwelt nicht sofort degradiert wird, setzt man üblicherweise bereits bei der Lysis einen Extraktionspuffer zu, der chemische Komponenten zum Schutz der DNA vor zellulären Nukleasen enthält. So wird z.B. EDTA zugesetzt, welches einen Chelatkomplex mit Mg-Ionen eingeht, die als Co-faktoren der DNase auftreten. Salzzusätze schaffen ein isotonisches Umfeld, wodurch die freie DNA ebenfalls stabilisiert wird.

(4) Trennung der DNA von Zellbestandteilen und der Probenmatrix

Die Trennung der freien DNA von zellulären Bestandteilen und Matrixresten erfolgt üblicherweise durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform oder einer Mischung aus Phenol und Chloroform, wobei die DNA in der wässrigen und störende Komponenten, wie Proteine, in der organischen Phase verbleiben.

(5) Reinigung der DNA

Die Aufreinigung der DNA kann entweder durch Zusätze, welche dem Extraktionspuffer beigemengt werden und Inhibitoren inaktivieren oder chelatisieren, oder mit Hilfe von DNA-Affinitätssäulen und Anionenaustauscherharzen erfolgen. Bei der Verwendung von Säulen können entweder die Störfaktoren gebunden und die DNA eluiert werden oder umgekehrt.

(6) Präzipitation und Konzentrierung der DNA

Die DNA-Fällung und Konzentrierung kann ebenfalls über Säulen oder mittels einer Alkoholfällung erfolgen. [Saunders, 1999]

3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung und zur Detektion eines bestimmten Abschnittes der DNA.

Prinzipiell kann dazu jedes beliebige DNA-Stück verwendet werden, solange zumindest die Sequenz von Start- und Endpunkt bekannt ist, da hier spezifische Oligonukleotide, die sog. Primer, hybridisieren müssen.

Zur Durchführung werden zusätzlich zur Templat-DNA, dem Primer forward und dem Primer reverse, eine hitzestabile Taq-Polymerase und die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine benötigt.

3.3.1. Die Reaktionskomponenten

DNA

Die Templat-DNA muss für die Verwendung intakt, rein ($OD_{260/280}$ 1,8-2) und in einer Menge von 10 fg bis ca. 200 ng (je nach Größe des Templats) verfügbar sein.

Primer

Die Primer müssen speziell für die Amplifikation eines DNA-Fragments maßgeschneidert werden. Sie bestimmen Start- und Endpunkt der Amplifikation und müssen zum jeweiligen Sequenzabschnitt der DNA-Stränge komplementär sein. Der Primer forward hybridisiert durch komplementäre Basenpaarung am 3'-Ende des einen Stranges und der Primer reverse am 3'-Ende des anderen Stranges. Die Primer sind üblicherweise zwischen 12 und 50 Basen lang und werden im Überschuss eingesetzt, dies entspricht meist einer Konzentration von 0,2-2 μ M.

Polymerase

Die Taq-Polymerase wird aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen, welcher in 70 °C heißen Quellen zu finden ist. Sie besitzt sowohl eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität als auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, eine 3'-Adenylierungsaktivität und auch eine reverse Transkriptaseaktivität. Sie wird für fast 90% aller PCRs eingesetzt, da sie relativ preiswert ist und eine hohe Prozessivität sowie Robustheit aufweist. Es gibt jedoch noch eine Reihe anderer hitzestabiler Polymerasen, wie Pfu (aus *Pyrococcus furiosus*), Pwo (aus *Pyrococcus woesei*), Tgo (aus *Thermococcus gorgonarius*), Tma bzw. UITmaTM (aus *Thermotoga maritima*) und Tli bzw. VentTM (aus *Thermococcus litoralis*). Sie weisen eine höhere Temperaturstabilität und/oder eine zusätzliche 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Korrektur- oder Proofreading-Aktivität) auf, dadurch sind sie jedoch auch komplizierter in der Handhabung und weisen auch eine niedrigere Prozessivität auf.

Die Taq-Polymerase hat ihr Arbeitsoptimum bei einer Temperatur von 72 °C und einem pH-Wert von 8. Um diesen pH-Wert zu gewährleisten, wird eine Pufferlösung bestehend aus Cl⁻-Ionen, Mg²⁺-Ionen und den dNTPs verwendet.

MgCl₂

Vor allem die MgCl₂-Konzentration (zw. 0,5 und 2,5 mM) ist ein wichtiger Faktor. Sie wird für die Enzymaktivität benötigt, beeinflusst Primerannealing, Trennung der DNA-Doppelstränge und bildet mit den Nukleotiden lösliche Komplexe, welche von der Polymerase erkannt werden. Des Weiteren werden die Produktspezifität, Fehlerrate und Bildung von Primerdimeren von der MgCl₂-Konzentration bestimmt. Die optimale Konzentration hängt von den Konzentrationen der verschiedenen Reaktionskomponenten ab und ist daher für jede PCR unterschiedlich und individuell zu bestimmen.

Desoxyribonukleosidtriphosphate

Auch für die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) spielt MgCl_2 eine wichtige Rolle. Sie bilden mit MgCl_2 lösliche Komplexe, welche von der Polymerase erkannt und mit deren Hilfe sie dann durch komplementäre Basenpaarung am jeweiligen 3'-Ende in den DNA-Strang eingebaut werden.

Andere Zusätze

Des Weiteren können Zusätze wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Betain und Formamid die Spezifität steigern. Andere Zusätze, wie z.B. Glycerin, PEG 6000, Tween®20 oder Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) können die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Heparin, SDS, Nonidet®P40 und Triton®X-100 hemmen die PCR, daher ist v.a. auf Kontamination der Templat-DNA, beispielsweise bei der DNA-Extraktion, zu achten. [Alberts et al., 2004; Müller, 2001; Müllhardt, 2006; Brown, 2002]

3.3.2. Ablauf der PCR

Die PCR besteht prinzipiell aus 3 Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation.

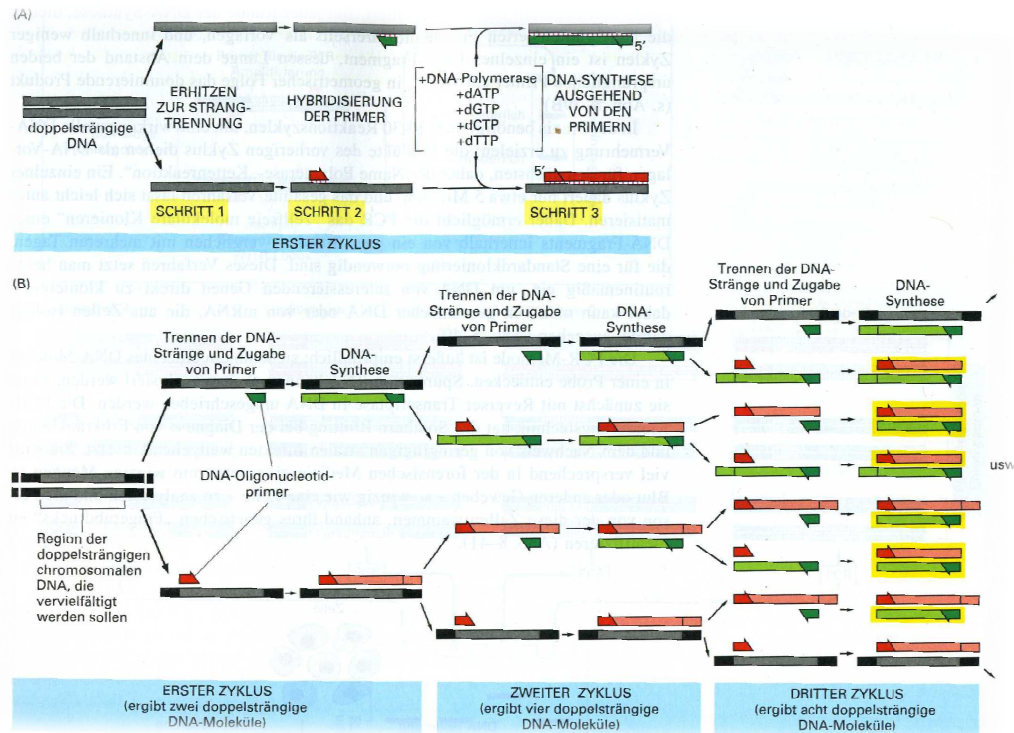


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der PCR [Alberts et al., 2004]

(1) Denaturierung

Bei der Denaturierung wird bei 95 °C der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge zerlegt.

(2) Annealing

Danach wird die Temperatur auf ca. 55-60 °C gesenkt und es lagern sich durch komplementäre Basenpaarung der Primer forward am 3'-Ende des einen DNA-Strangs und der Primer reverse an dem des anderen an. Die Temperatur richtet sich hier nach den jeweiligen optimalen Annealingtemperaturen der Primer.

(3) Elongation

Im Anschluss erfolgt mit Hilfe der Taq-Polymerase und den dNTPs die Synthese des neuen DNA-Doppelstrangs. Bei diesem Schritt wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur von 72 °C der Taq-Polymerase erhöht.

Diese drei Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt, wobei sich die Anzahl der DNA-Segmente, solange die Menge an Primer und Nukleotide

ausreicht, nach jedem Zyklus verdoppelt. Üblicherweise werden bei der PCR 25-30 Zyklen durchgeführt (bei der Real Time PCR bis zu 50).

Die Durchführung der PCR erfolgt in einem Thermocycler, in dem 96-Well- oder 384-Well-Mikrotiterplatten eingesetzt werden können.

Im Anschluss an die PCR erfolgt eine Analyse der PCR-Produkte entweder durch Gelelektrophorese, Klonierung oder Sequenzierung.

Am häufigsten wird eine Agarosegelelektrophorese an das Experiment angeschlossen. Dazu wird ein Teil der amplifizierten DNA-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen, welches zur Sichtbarmachung der DNA Ethidiumbromid enthält. Mittels Elektrophorese werden die Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe eines zusätzlich aufgetragenen Längenmarkers lässt sich die Größe bestimmen. [Alberts et al., 2004; Brown, 2002; Müller, 2001; Müllhardt, 2006]

3.4. Real Time PCR

Bei der Real Time PCR erfolgt die Detektion und Quantifizierung der amplifizierten DNA durch Ausnützung von Fluoreszenzeigenschaften direkt während des PCR-Ablaufs.

Bei der herkömmlichen PCR musste dafür der Prozess angehalten, Aliquote entnommen, auf ein Gel aufgetragen und gegebenenfalls eine Hybridisierung angehängt werden.

Zu Beginn der Real Time PCR wurde der Interkalator Ethidiumbromid eingesetzt, welcher sich jedoch nur sehr schlecht eignet. Heute steht eine ganze Reihe von Methoden zum spezifischen Nachweis von doppelsträngiger DNA zur Verfügung. [Müllhardt, 2006; Müller, 2001]

3.4.1. Methoden der Real Time PCR

- SYBR Green®

Bei dieser Variante wird dem Reaktionsansatz ein interkalierender Farbstoff, meist SYBR Green®, zugegeben, der sich bei Ausbildung eines DNA-Doppelstranges zwischen die Stränge einlagert (siehe Abb. 4). Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit kurzwelligem UV-Licht wird längerwelliges Licht emittiert und je mehr doppelsträngige DNA gebildet wird, umso höher wird das Fluoreszenzsignal.

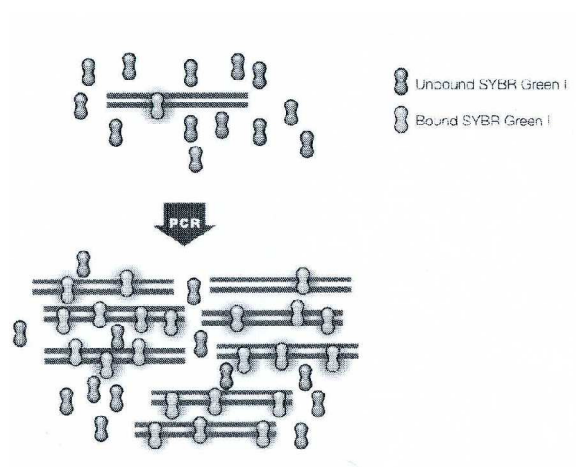


Abbildung 4: Funktionsweise von SYBR Green® [BioRad Laboratories, 2006]

Der große Vorteil liegt in der weitreichenden Verwendbarkeit und der hohen Signalstärke.

Die Methode ist jedoch nicht sehr spezifisch, da jeder DNA-Doppelstrang detektiert wird. Deshalb hat es sich bewährt, im Anschluss eine Schmelzpunktanalyse zur Untersuchung der Spezifität der Amplifikation durchzuführen. Hierbei wird die Temperatur schrittweise erhöht und bei einer für das Amplikon spezifischen Schmelztemperatur (T_m) wird der DNA-Doppelstrang wieder aufgetrennt und der Farbstoff wieder frei - eine Abnahme des Fluoreszenzsignals wird beobachtet.

Gegebenenfalls kann auch hier noch eine Agarosegelelektrophorese, zur eindeutigen Identifizierung der Amplifikate durch ihre Größe, angehängt werden.

Ein weiterer Nachteil des SYBR Green®-Assays ist, dass durch die fehlende Spezifität dieser nicht für Multiplex-Real Time PCRs einsetzbar ist. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001; Müllhardt, 2006]

- TaqMan®-Sonde

Bei dieser Variante wird, zusätzlich zu den spezifischen Primern, eine TaqMan®-Sonde verwendet, die ebenfalls komplementär zu einem der DNA-Stränge sein muss und zwischen Primer forward und Primer reverse liegt. Das eine Ende der Sonde ist mit einem Fluorophor, einem sog. Reporter, und das andere Ende mit einem Quencher markiert. Sind sich diese räumlich nahe, kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung. Beim Annealing lagern sich die TaqMan®-Sonde sowie die Primer an den DNA-Strang an. Beginnt nun die Taq-Polymerase den DNA-Doppelstrang mit den dNTPs zu synthetisieren, wird die Sonde durch die gleichzeitige 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, beginnend an ihrem 5'-Ende, abgebaut. Wegen der dadurch bedingten räumlichen Trennung von Reporter und Quencher kommt es zu einem detektierbaren Fluoreszenzsignal. (siehe Abb. 5)

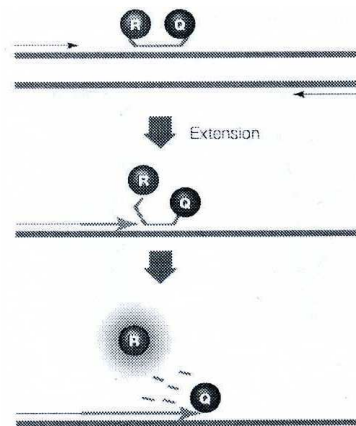


Abbildung 5: Funktionsweise der TaqMan®-Sonde [BioRad Laboratories, 2006]

Der Vorteil liegt hier in der hohen Spezifität der Sonde und dem guten Signal-Rausch-Verhältnis. Die Methode ist jedoch teurer und das Entwerfen der Sonde aufwendiger.

Ein großer Vorteil der Methode ist, dass durch die Spezifität der Sonde und unter Verwendung verschiedener Fluorophorfarbstoffe und Quencher diese Methode hervorragend für Multiplex-Real Time PCRs geeignet ist.

Üblicherweise werden die Fluorophore FAM und Cy5 und die Quencher BHQ 1 und BHQ 2 verwendet. [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001; Müllhardt, 2006]

- Andere Varianten

Molecular Beacon

Bei dieser Variante wird ebenfalls eine sequenzspezifische Sonde verwendet, welche am 5'-Ende mit einem Fluorophor (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert ist. Hier kommt allerdings noch hinzu, dass 5'-Ende und 3'-Ende der Sonde komplementär sind, so dass sie im nicht-hybridisierten Zustand eine Haarnadelstruktur ausbilden. Dabei sind sich Reporter und Quencher so nahe, dass es zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Wird die Sonde allerdings, nach der Denaturierung, im Annealingschritt an den DNA-Einzelstrang angelagert, entfernen sich Reporter und Quencher räumlich voneinander und das Fluoreszenzsignal kann gemessen werden (siehe Abb. 6). Im Elongationsschritt wird die Sonde wieder verdrängt, die Haarnadelstruktur bildet sich erneut aus und das Fluoreszenzsignal wird wieder gelöscht.

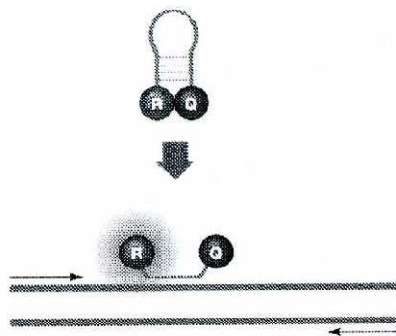


Abbildung 6: Funktionsweise der Molecular Beacon-Sonde [BioRad Laboratories, 2006]

Hohe Spezifität und dadurch bedingte Verwendung für Multiplex-Experimente machen die Vorteile der Methode aus, ein Nachteil besteht

jedoch im aufwendigen Sondendesignen. [Müller, 2001; BioRad Laboratories, 2006]

FRETTM (Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer)

Bei dieser Variante der Hybridisierungssonden werden zwei unterschiedliche sequenzspezifische Sonden mit zwei verschiedenen Fluorophoren verwendet. Der eine Fluorophor sitzt am 3'-Ende der ersten Sonde (R1) und der andere am 5'-Ende der zweiten (R2). (siehe Abb. 7a) Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges lagern sich im Annealingschritt beide Sonden an den Einzelstrang an. Die beiden Fluorophore befinden sich dadurch in räumlicher Nähe und ein Energietransfer kann stattfinden. Wird nun der erste Fluorophor mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) angeregt, emittiert er Licht in einer anderen Wellenlänge (E1). (siehe Abb. 7b) Entspricht nun das emittierte Licht des ersten Fluorophors dem Anregungslicht des sich in räumlicher Nähe befindlichen zweiten ($E1=A2$), wird die Energie nicht in Form des Emissionslichts von Fluorophor 1, sondern von Fluorophor 2 (E2) abgegeben. So lässt sich bei der PCR verfolgen, ob die Fluorophore getrennt (E1 wird gemessen) oder einander nahe vorliegen (E2 wird gemessen).

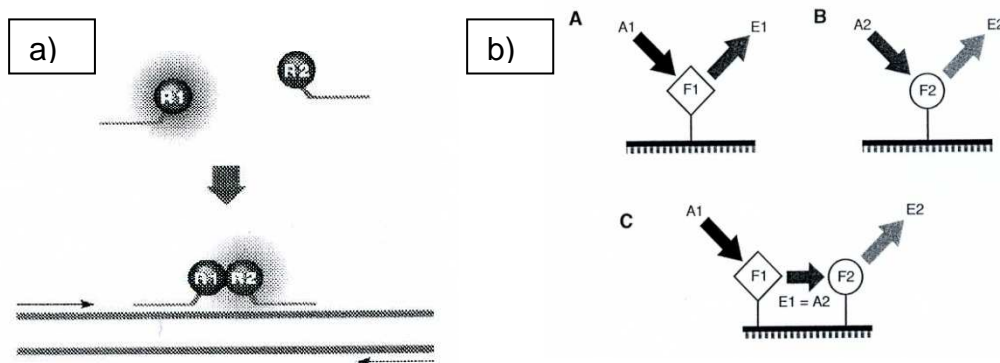


Abbildung 7: Funktionsweise der Hybridisierungssonde [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]

Im Elongationsschritt werden beide Sonden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wieder abgebaut. [BioRad Laboratories, 2006; Müllhardt, 2006; Müller, 2001]

Eclipse-Sonde

Bei dieser Variante befindet sich der Reporter am 3'-Ende und der Quencher zusammen mit einem Minor Groove Binder (MGB) am 5'-Ende einer sequenzspezifischen Sonde. In nicht-hybridisierter Form nimmt die Sonde eine Formation ein, so dass sich Reporter und Quencher räumlich so nahe sind, dass es zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Im Annealingschritt lagert sich die Sonde mit Hilfe des MGB an den DNA-Strang an und es kommt zu einer Linearisierung der Sonde und einer dadurch bedingten räumlichen Trennung von Reporter und Quencher – ein Fluoreszenzsignal wird detektiert. (siehe Abb. 8) [BioRad Laboratories, 2006]

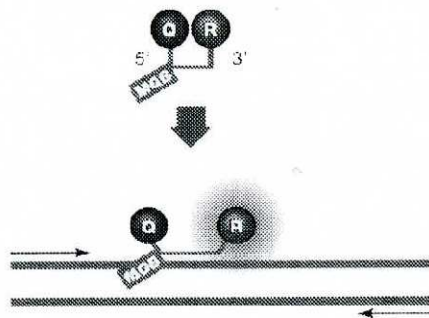


Abbildung 8: Funktionsweise der Eclipse-Sonde [BioRad Laboratories, 2006]

Amplifluor-Primer

Bei dieser Methode werden zwei DNA-spezifische Primer und ein universeller Primer (UniPrimer) verwendet. Ein Teil der Sequenz (Z-Sequenz) des einen spezifischen Primers ist auch im UniPrimer vorhanden. Des Weiteren ist der UniPrimer mit Reporter und Quencher ausgestattet, zwischen welchen sich eine Haarnadelstruktur ausbildet. Durch die räumliche Nähe kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung.

Im 1. Amplifizierungszyklus lagert sich der spezifische Primer (welcher die Z-Sequenz besitzt) an den DNA-Strang an und ein neuer DNA-Doppelstrang wird synthetisiert. Im 2. Zyklus wird mit Hilfe des zweiten

spezifischen Primers ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der nun auch eine komplementäre Z-Sequenz enthält. Dieser DNA-Strang aus dem 2. Zyklus dient nun dem UniPrimer als Target und im 3. Zyklus lagert sich dieser an die Target-DNA an und synthetisiert einen neuen DNA-Strang. Im 4. Zyklus dient nun der DNA-Strang, welcher den Uni-Primer enthält, als Target und die Synthese des neuen DNA-Stranges führt zur Linearisierung und dadurch bedingter Öffnung der Haarnadelstruktur. Dadurch sind Reporter und Quencher so weit räumlich voneinander getrennt, dass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

In Abb. 9 sind die Abläufe der einzelnen Zyklen schematisch dargestellt.

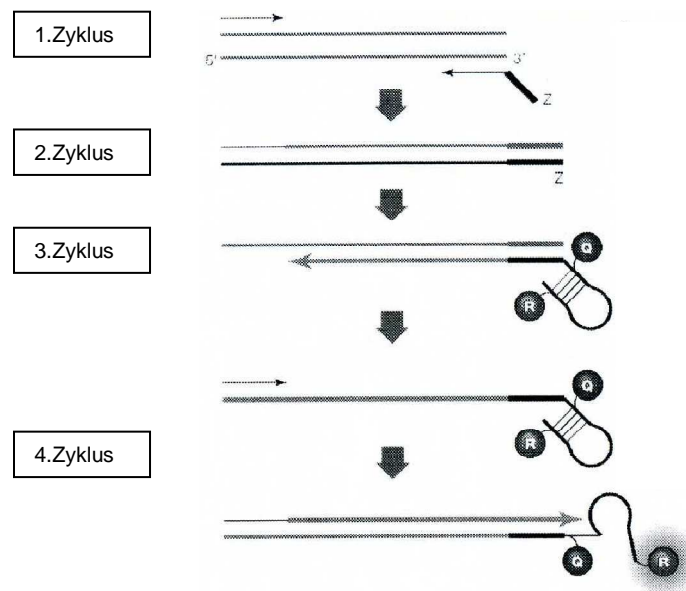


Abbildung 9: Funktionsweise der Amplifluor-Methode [BioRad Laboratories, 2006]

Scorpions

Bei dieser Variante werden zwei sequenzspezifische Primer verwendet, wobei einer der beiden gleichzeitig als Sonde fungiert. Dieser Primer verfügt an seinem 5'-Ende über ein Blocker-Molekül, gefolgt von einem Quencher und einem Reporter, zwischen welchen sich eine Haarnadelstruktur ausbildet. Innerhalb dieser Haarnadelstruktur befindet sich noch eine zusätzliche targetspezifische Sequenz. Das Blocker-Molekül verhindert eine Synthese des komplementären Strangs in 3'-Richtung über den Blocker hinaus.

Im 1. Zyklus lagert sich der Primer an und ein neuer DNA-Strang wird synthetisiert. Im 2. Zyklus wird die Haarnadelstruktur durch Denaturierung geöffnet und die spezifische Sequenz innerhalb der Haarnadelstruktur wird durch intramolekulare Wechselwirkungen am selben DNA-Strang gebunden. Dies bewirkt die räumliche Trennung von Reporter und Quencher und ein Fluoreszenzsignal wird detektiert. [Müller, 2001; BioRad Laboratories, 2006]

Die Abb. 10 zeigt den schematischen Verlauf der Detektion mit Scorpions.

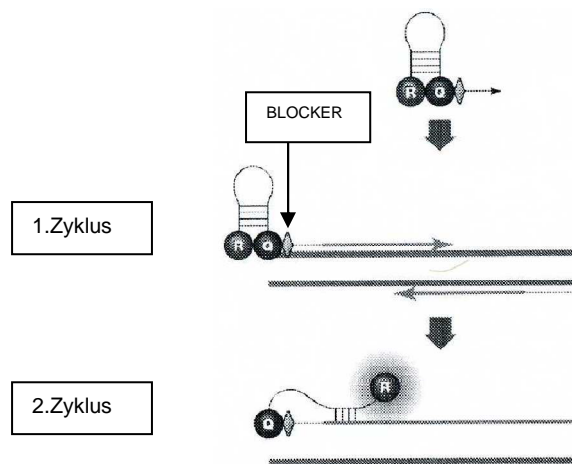


Abbildung 10: Funktionsweise der Scorpions [BioRad Laboratories, 2006]

LUX Primer

Bei dieser Methode werden ebenfalls zwei sequenzspezifische Primer verwendet, wobei einer der beiden Primer eine Haarnadelstruktur ausbildet und an seinem 3'-Ende mit einem Fluorophor markiert ist. Er enthält keinen Quencher, wird jedoch durch die Sekundärstruktur der Haarnadel gequencht. Durch das Öffnen der Haarnadelstruktur und den Einbau in den DNA-Strang kommt es zu einem Fluoreszenzsignal. (siehe Abb. 11) [BioRad Laboratories, 2006]

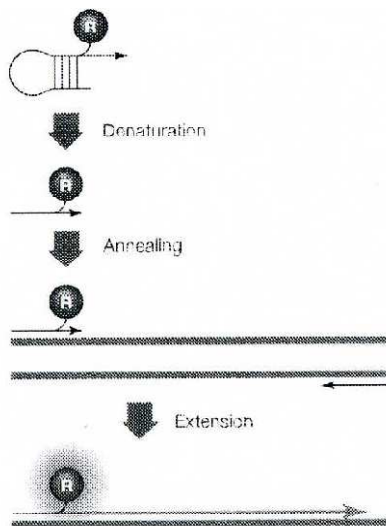


Abbildung 11: Funktionsweise der LUX-Primer [BioRad Laboratories, 2006]

BD QZyme Primer

Diese Methode arbeitet mit einem sequenzspezifischen zymogenen Primer, einem sequenzspezifischen Primer Reverse und einem Oligonukleotidsubstrat, welches an seinem 5'-Ende mit einem Reporter und an seinem 3'-Ende mit einem Quencher markiert ist, deren räumliche Nähe zu einer Fluoreszenzlöschung führt. Der zymogene Primer enthält eine Sequenz, die eine katalytische DNA kodiert.

Im 1. Zyklus lagert sich der zymogene Primer an die Target-DNA und ein neuer DNA-Strang wird synthetisiert. Dieser dient im 2. Zyklus als Target für den Primer Reverse, der sich nun anlagert und die Synthese eines neuen DNA-Stranges, der eine katalytische DNA-Region enthält, kann stattfinden. In einem nachfolgenden Annealingschritt kann nun das Oligonukleotid mit Reporter und Quencher an die katalytische DNA-Sequenz binden, was zu einer Trennung von Reporter und Quencher bzw. zu einem Fluoreszenzsignal führt. [BioRad Laboratories, 2006]

Die Abbildung 12 zeigt den schematischen Verlauf der Zyklen.

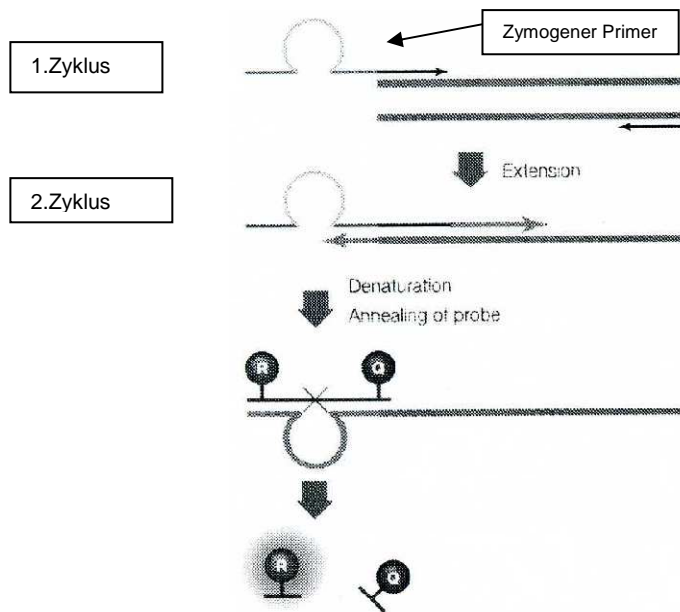


Abbildung 12: Funktionsweise der BD QZyme Primer [BioRad Laboratories, 2006]

3.4.2. Auswertung

Bei der Real Time PCR wird nicht die absolute Menge an amplifizierter DNA zur Quantifizierung herangezogen, sondern man macht sich hier die Reaktionskinetik zu nutze.

Betrachtet man eine Amplifikationskurve (Abb. 13), in der das Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird, zeigt sich nach einer kurzen Anfangsphase ein exponentieller Anstieg, der gegen Ende der Reaktion in ein Plateau übergeht. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich zu Beginn die Menge an PCR-Produkten in jedem Zyklus verdoppelt, gegen Ende jedoch die Reaktion durch die steigende Anzahl an Produkten und die Abnahme der Konzentration von Primern, Nukleotiden und Polymerase etc. gehemmt wird.

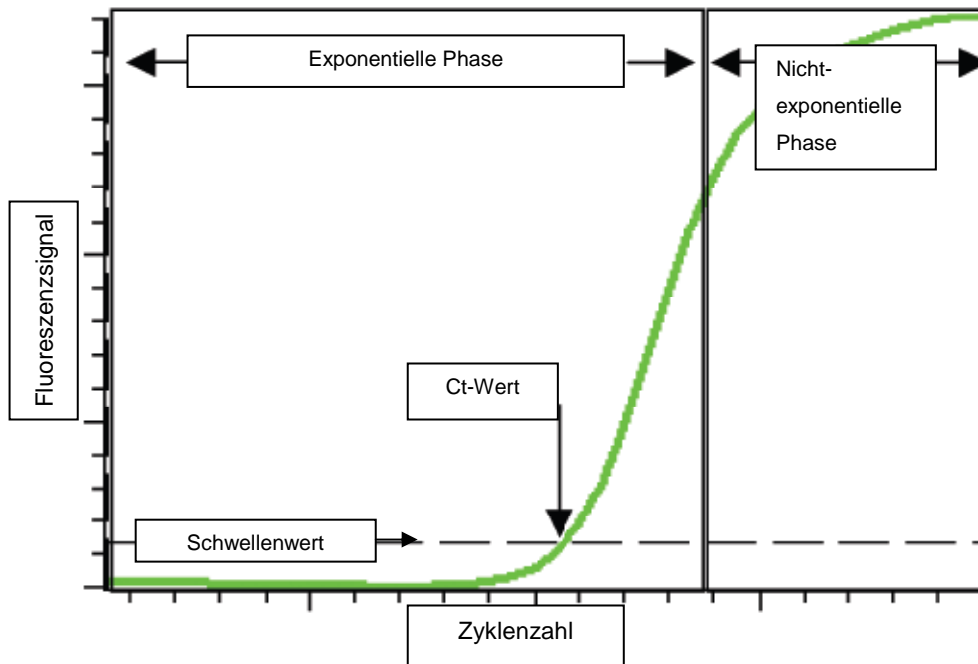


Abbildung 13: Amplifikationskurve [BioRad Laboratories, 2006]

Die Auswertung erfolgt über den Threshold Cycle (=Ct-Wert). Der Ct-Wert ist jene Zyklenzahl, bei der genügend DNA amplifiziert wurde, so dass sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt. Zur Ermittlung des Ct -Wertes wird vom Anwender händisch die sogenannte Schwellenlinie durch den exponentiellen Bereich der Kurve gelegt. Der Schnittpunkt zwischen der Schwellenlinie und der Amplifikationskurve stellt den Ct -Wert dar. Signale oberhalb dieser Schwellenlinie werden als positiv und Signale, die unterhalb dieser Linie verbleiben, werden als negativ gewertet.

Der Ct -Wert hängt von der Menge an Templat-DNA ab, die zu Beginn der Reaktion vorhanden ist. Bei einer hohen Ausgangskonzentration an DNA sind wenige Zyklen erforderlich, bis sich das Signal ausreichend vom Hintergrund abhebt, ist allerdings nur wenig Ausgangs-DNA vorhanden, dauert es mehrere Zyklen, bis ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Je höher also die Ausgangskonzentration, umso niedriger der Ct -Wert.

Um die Konzentration einer unbekannten Probe zu bestimmen, muss eine Standardfunktion ermittelt werden. [Müllhardt, 2006; BioRad Laboratories, 2006; Holzhauser et al., 2006]

Zur Ermittlung der Standardfunktion wird ein DNA-Extrakt bekannter Konzentration seriell verdünnt und gemessen. Im Anschluss wird der Logarithmus der jeweiligen Konzentration zu Beginn der PCR gegen die erhaltenen Ct -Werte aufgetragen. Aus der Steigung der so ermittelten Gerade kann die Effizienz der Amplifikation über die Gleichungen

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

bzw.

$$E[\%] = (E-1) \cdot 100$$

E...Amplifikationseffizienz

ermittelt werden. Für eine optimale Amplifikation (Verdopplung der Amplifikate in jedem Zyklus) erhält man eine Effizienz von $E=2$ bzw. $E[\%]=100$. Eine gute Effizienz spricht für eine robuste, reproduzierbare Methode und sollte experimentell zwischen 90 und 105% liegen.

Der Korrelationskoeffizient R^2 gibt Aufschluss darüber, wie gut sich die experimentellen Daten in die Regressionsgerade einfügen, d.h. ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Ausgangskonzentration und dem Ct-Wert besteht, und er sollte einen Wert $>0,980$ aufweisen. [BioRad Laboratories, 2006]

Abb. 14 zeigt ein Beispiel für die Ermittlung der Standardfunktion für seriell verdünnte Erdnuss-DNA.

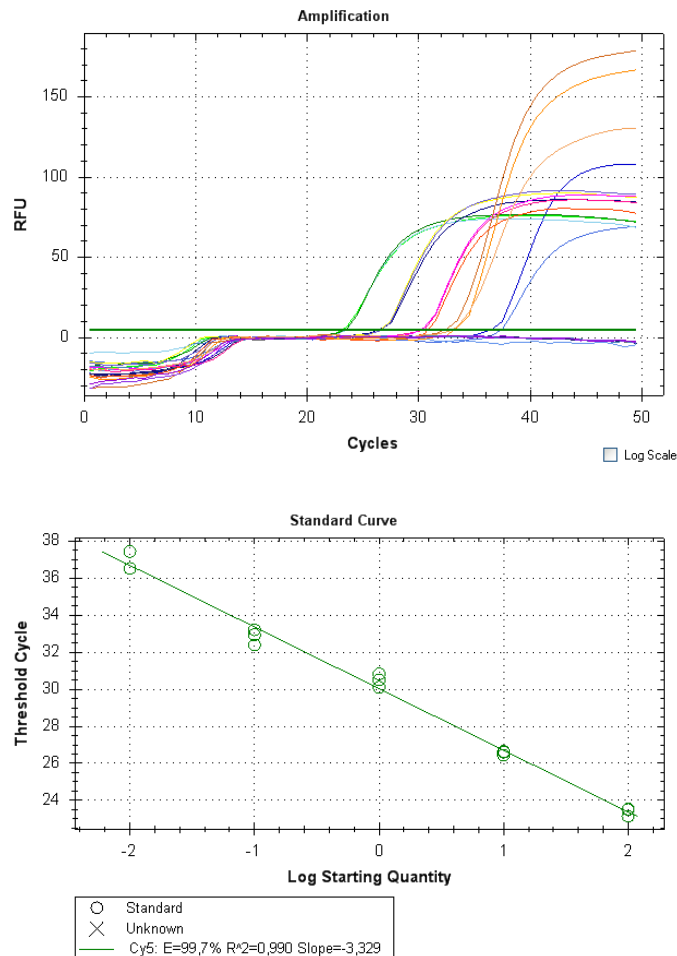


Abbildung 14: Amplifikationskurven und Standardkurve für seriell verdünnte Erdnuss-DNA

3.5. Multiplex-Real Time PCR

Bei der Real Time PCR ist es auch möglich, mehrere unterschiedliche spezifische DNA-Sequenzen in einem Well zu amplifizieren und zu detektieren. Dazu werden pro DNA-Sequenz ein Primer forward, ein Primer reverse und eine spezifische Sonde benötigt. Die Primer und Sonden müssen so gewählt werden, dass sie nicht miteinander hybridisieren und sie müssen unter ähnlichen Bedingungen (Temperatur etc.) arbeiten. Zur Detektion der unterschiedlichen Amplifikate werden die spezifischen Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren, welche sich im Emissionsspektrum unterscheiden und nicht überlappen, und Quenchern markiert. [BioRad Laboratories, 2006]

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die TaqMan®-Sonde für das Sesamallergen z.B. mit dem Reporter FAM und dem Quencher BHQ 1 und für das Erdnussallergen mit dem Reporter Cy5 und dem Quencher BHQ 2 markiert.

3.6. Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Bei der Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente auf spezielle Gele aufgetragen und es wird ein elektromagnetisches Feld angelegt. Durch die negative Ladung der Nukleotide wandert die DNA dabei zur Anode, wobei längere Fragmente stärker retardiert werden als kürzere. Üblicherweise werden bei Fragmenten, die kleiner als 0,5 kb sind, spezielle Polyacrylamidgele eingesetzt. Bei größeren Fragmenten werden die poröseren Agarosegele benötigt. Die Trennung von sehr großen DNA-Fragmenten erfolgt mit einer erweiterten Agarosegelelektrophorese (=Pulselektrophorese), dabei wird die Richtung des elektromagnetischen Feldes periodisch geändert, die DNA muss sich immer wieder neu orientieren und eine „schlangenartige“ Ausrichtung, welche zu größenunabhängigen Wanderungsgeschwindigkeiten führt, kann verhindert werden. Mit der Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb durch Variation der Agarosekonzentrationen analysieren.

Eine Sichtbarmachung der DNA erfolgt meist mit Ethidiumbromid, einem Interkalator, welcher sich in die DNA einzulagern vermag und unter UV-Licht sichtbar ist. Die Länge der DNA-Fragmente lässt sich mit einem zusätzlich auf das Gel aufgetragenen DNA-Größenmarker mit charakteristischem Bandenmuster bestimmen. [Alberts et al., 2004; Müllhardt, 2006]

3.7. Photometrie

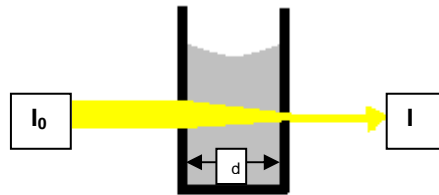


Abbildung 15: Abnahme der Intensität eines Lichtstrahls beim Durchgang durch eine Küvette; modifiziert nach [Otto, 2000]

Die photometrische Messung gehört zu der UV/VIS-Spektroskopie und basiert auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, welches den Zusammenhang zwischen der Extinktion und der molaren Konzentration des Analyten, wie folgt, beschreibt:

$$E = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$$

E...Extinktion

I_0 ...Anfangsintensität des Lichtes

I...Intensität des durchgelassenen Lichtes

$\varepsilon(\lambda)$...molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]

d...Schichtdicke der Küvette [cm]

c...Konzentration des Analyten [mol/l]

Die Messung erfolgt in einer mit der flüssigen Probe befüllten Küvette, durch die ein monochromatischer Lichtstrahl mit einer Anfangsintensität I_0 geschickt wird. Durch Absorption der Probe und Küvette, Reflexion und Streulicht kommt es zu einer Abnahme der Intensität, wobei letztere durch Referenzmessungen mit einer Blindprobe korrigiert werden können. [Otto, 2000]

4. ERGEBNISSE

4.1. DNA-Extraktion

4.1.1. DNA-Extraktion von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten

Prinzipiell wurde zur DNA-Extraktion aus den Lebensmitteln bzw. den Lebensmittelzutaten die CTAB-Methode verwendet. Dabei musste eine DNA-Konzentration von mindestens 20 ng/µl und eine Reinheit (OD_{260}/OD_{280}) zwischen 1,8 und 2 erreicht werden. Erst wenn nach mehreren Versuchen die DNA nicht in ausreichender Konzentration oder mit ungenügender Reinheit extrahiert werden konnte, wurde eine DNA-Extraktion mittels QIAamp® DNA Mini Kit oder DNA Stool Kit durchgeführt. Das genaue Prozedere der unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden ist in Kap. 5.2. zu finden.

Mit der CTAB-Methode konnten gute Ergebnisse erzielt werden, lediglich die DNA-Extrakte der Schokoladenkekse und der Erdnussbutter zeigten eine etwas geringere Reinheit und die Ingwerschokolade, die Butterkekse und die getrockneten Feigen konnten nicht aufgearbeitet werden. Doch im Falle der Ingwerschokolade, der Butterkekse und der Feigen versagten auch die QIAamp® Kits. Diese drei Proben wurden daher nicht zur weiteren Analyse herangezogen. Die folgende Tabelle zeigt einige Beispiele der zur weiteren Analyse verwendeten Extrakte, welche mit der CTAB-Methode erhalten wurden.

Tabelle 2: Ergebnisse der DNA-Extraktion mit der CTAB-Methode

Probe	Einwaage [mg]	OD₂₆₀/OD₂₈₀	Konzentration [ng/µl]
Kürbiskerne	109	1,9	25,50
Paranuss	111	1,9	32,50
Walnuss	110	1,8	64,75
Pinienkerne	105	1,9	215,00
Macadamia	105	2,0	20,00
Pekanuss	104	2,0	21,50
Erdnuss	104	1,9	195,75
Kichererbsen	106	1,9	46,25
Linsen	112	1,9	92,75
weiße Bohnen	106	1,9	62,00
Sesam	106	1,9	99,00
schwarzer Sesam	107	1,9	76,50
Haselnuss	112	1,9	38,50
Pistazie	110	2,0	191,25
Paranuss	100	1,9	17,50
Salzcracker	111	2,0	64,00
Schokoladenkekse	116	1,6	51,00
Kinderkekse	98	1,9	295,50
Erdnussflocken	104	1,9	46,25
Sesam-Grissini	116	1,9	73,75
Bio-Vitalkekse	94	2,0	551,00
Sesam-Krokant	99	2,0	170,50
Erdnuss-Krokant	97	2,0	422,00
Müsliriegel Traube	117	2,0	438,50
Müsliriegel Cranberry	118	2,0	201,50
Sesam-Kekse	110	1,9	223,75
Erdnussbutter	158	1,6	220,75
Dinkelkekse	100	2,0	362,25
Knäckebröt	113	1,8	225,75
Amaranthriegel	95	1,9	406,00
Müsliriegel	103	1,9	212,50
Sesambrötchen	93	1,8	218,25

4.1.2. DNA-Extraktion von mit Sesam und Erdnuss gespikten Proben

Die beiden Matrices Zwieback und Grissini wurden mit Sesam und Erdnuss gespickt (siehe Kap. 5.1.2.) und mittels der CTAB-Methode extrahiert (siehe Kap. 5.2.2.).

Aus dem gespickten Zwieback konnte die DNA ohne Probleme in einer Konzentration von > 20 ng/µl und einer Reinheit von 1,8 bis 2,0 extrahiert werden (siehe Tab. 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der DNA-Extraktion aus gespiktem Zwieback mit der CTAB-Methode

Probe	Einwaage [mg]	OD₂₆₀/OD₂₈₀	Konzentration [ng/μl]
Zwieback 1%	95	1,9	226,75
Zwieback 0,5%	106	1,8	220,00
Zwieback 0,1%	94	1,9	184,50
Zwieback 0,05%	99	1,8	166,50
Zwieback 0,01%	117	1,8	278,75
Zwieback 0,005%	113	1,8	163,75
Zwieback 0,001%	94	1,8	165,75
Zwieback	97	1,8	122,75

Bei der DNA-Extraktion der gespikten Grissinis gab es anfangs einige Probleme. In zwei von drei Aufarbeitungsversuchen (an verschiedenen Tagen) konnte die DNA entweder nicht in ausreichender Konzentration oder Reinheit (oder beides) gewonnen werden (siehe Tab. 4). Die in Tab. 4 grau unterlegten Extrakte wurden trotz der zum Teil schlechten Ergebnisse im Duplex-Assay getestet (siehe Kap. 4.3.4.2.).

Durch Verlängerung der beiden Inkubationszeiten der CTAB-Methode um ein bis zwei Stunden zeigte sich jedoch im dritten Aufarbeitungsversuch eine deutliche Steigerung der Konzentration und auch die Reinheit wurde etwas besser. Es mussten hier jedoch auch einige Proben mit geringerer Reinheit (< 1,8) weiterverwendet werden (siehe Tab. 5). Von diesem Aufarbeitungsversuch wurden die Extrakte ebenfalls im Duplex-Assay getestet (siehe Kap. 4.3.4.2.).

Tabelle 4: Ergebnisse des ersten Versuchs der DNA-Extraktion der gespikten Grissinis mit der CTAB-Methode

Probe	Einwaage [mg]	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Konzentration [ng/μl]
Grissini	95	1,6	11,00
	98	1,6	18,75
	100	1,5	27,00
Grissini 1%	105	1,5	37,75
	111	1,4	48,75
	107	1,5	15,75
Grissini 0,5%	102	1,5	45,75
	90	1,2	8,25
	96	1,7	15,50
Grissini 0,1%	111	1,4	35,50
	97	1,5	16,00
	110	1,9	36,25
Grissini 0,05%	109	1,5	37,25
	111	1,4	29,50
	102	1,5	23,75
Grissini 0,01%	105	1,4	17,00
	104	1,6	10,50
	110	1,5	15,75
Grissini 0,005%	105	1,4	24,25
	104	2,2	30,75
	108	1,5	4,50
Grissini 0,001%	109	1,5	25,75
	97	1,9	31,25
	110	1,7	28,75

Tabelle 5: Verwendete DNA-Extrakte der gespikten Grissinis (3. Aufarbeitungsversuch)

Probe	Einwaage [mg]	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Konzentration [ng/μl]
Grissini 1%	101	1,9	96,25
Grissini 0,5%	110	1,6	102,75
Grissini 0,1%	98	1,6	99,50
Grissini 0,05%	111	1,6	99,25
Grissini 0,01%	100	1,7	57,00
Grissini 0,005%	101	1,5	82,00
Grissini 0,001%	111	1,5	105,25
Grissini	90	1,6	53,75

4.2. Entwicklung einer Real Time PCR-Methode zur Detektion von potenziell allergener Erdnuss

4.2.1. Primer und Sonden

Zur Entwicklung eines TaqMan®-Duplex-Assays zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Erdnuss in Lebensmittelproben sollten die spezifischen Primer und die TaqMan®-Sonde der Erdnuss passend zu den bereits vorhandenen des Sesams entworfen werden. Die Sesamprimer und die TaqMan®-Sonde waren in unserer Arbeitsgruppe bereits zur Entwicklung eines Singleplex- und eines Duplex-Assays (Sesam und Haselnuss) verwendet worden.

Zum Entwerfen von Primern und Sonde wurden die Gene, die für die Erdnussallergene Agglutinin, Oleosin und Ara h 6 codieren und deren Sequenzen bereits bekannt waren, herangezogen. Zu jedem Allergen wurde ein Primerpaar mit zugehöriger TaqMan®-Sonde passend zu den Sesam-Primern und der Sesam-Sonde ausgesucht. Die Sesam-Primer waren spezifisch für einen Abschnitt des Gens, das für das Sesamallergen Ses i 1 codiert. Der genaue Vorgang des Designs und die Auswahlkriterien werden in Kap. 5.4.4. beschrieben.

In der Tabelle 6 sind die Sequenzen, Schmelztemperaturen und Amplikonlängen der Erdnuss-/Sesam-Primer und der TaqMan®-Sonden aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Primer und TaqMan®-Sonden

Primer/Sonde	Sequenz 5'→3'	Tm [°C]	Amplikonlänge [bp]	Tm [°C]
Sesam-Primerpaar & Sonde (Ses i 1, Accessionnr. AF240005)				
Primer forward	TGAGGAACGTGGACGAGAG	56,5	117	79,4
Primer reverse	CCCTAGCCCTCTGGTAAACC	57,1		
TaqMan®-Sonde	FAM- CACCTCCTGCTGCTGCTGCC- BHQ1	66,5		
Erdnuss-Primerpaar 2 & Sonde (Oleosin, Accessionnr. AF325918)				
Primer forward	TGATTAAC TTCATCCGACAGGTAC	57,3	91	76,4
Primer reverse	ACGTAATCCGCCATGTCTGC	58,8		
TaqMan®-Sonde	Cy5- CGCCGCTTCGCCGAGTCCAGC- BHQ2	69,1		
Erdnuss-Primerpaar 1 (Agglutinin, Accessionnr. S42352)				
Primer forward	ACCACCATTGCTCAAGTTGTTG	58,4	125	75,5
Primer reverse	GAAGTGAAAGACCATGAACGGATG	59,1		
Erdnuss-Primerpaar 3 (Ara h 6, Accessionnr. AY871100)				
Primer forward	TGAACGAGATGGAGAACACACAG	59,3	81	72,8
Primer reverse	CCTGCAACCTATCGCACTGG	59,1		

4.2.2. Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

Um eine effiziente Amplifizierung zu erreichen, wurden sowohl die Konzentrationen als auch die Annealingtemperaturen aller 3 Erdnuss-Primerpaare optimiert. Die Primer wurden jeweils in den Konzentrationen 100, 200 und 300 nM getestet und die Annealingtemperatur wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten (52,8-62,0°C) bestimmt. Die Versuchsdurchführung ist in Kap. 5.5.1. beschrieben.

Abb. 16 zeigt die mit dem Primerpaar 2 erhaltenen PCR-Kurven.

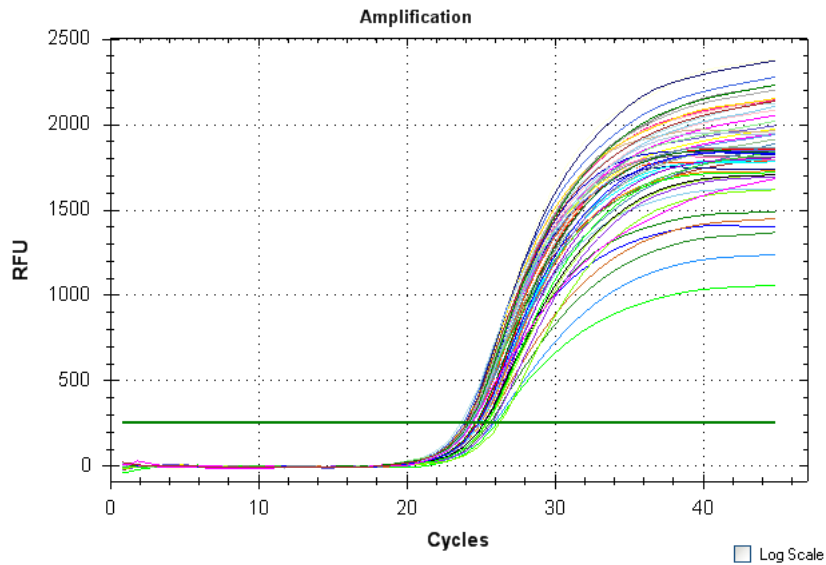


Abbildung 16: Bei der Primeroptimierung erhaltene Amplifikationskurven (Primerpaar 2)

Zur Bestimmung der optimalen Primerkonzentration bzw. Annealingtemperatur wurde der niedrigste Ct-Wert und höchste ΔR_n -Wert herangezogen, wobei der Ct-Wert mehr gewichtet wurde. Die folgenden Abbildungen zeigen die Abhängigkeit der Ct-Werte von der Annealingtemperatur und den unterschiedlichen Primerkonzentrationen. Die rote Linie zeigt die jeweils ausgewählten Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Primerpaare.

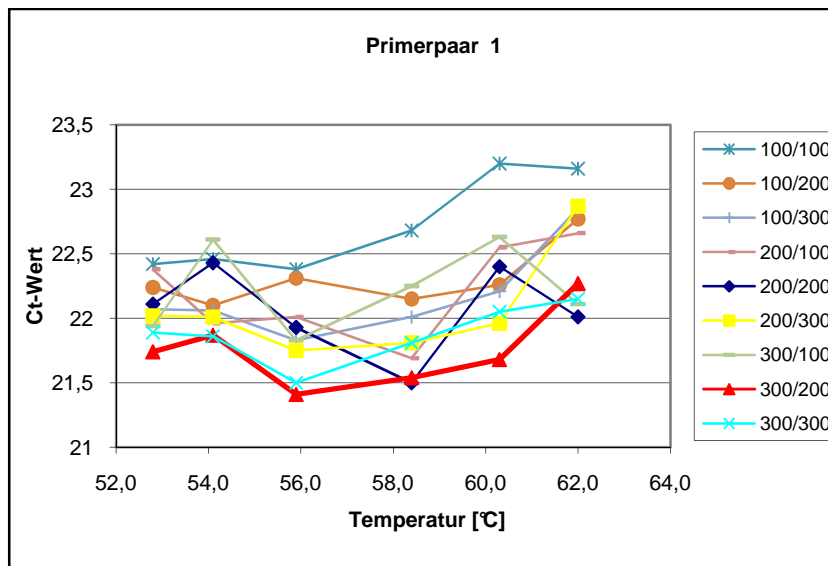


Abbildung 17: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 1

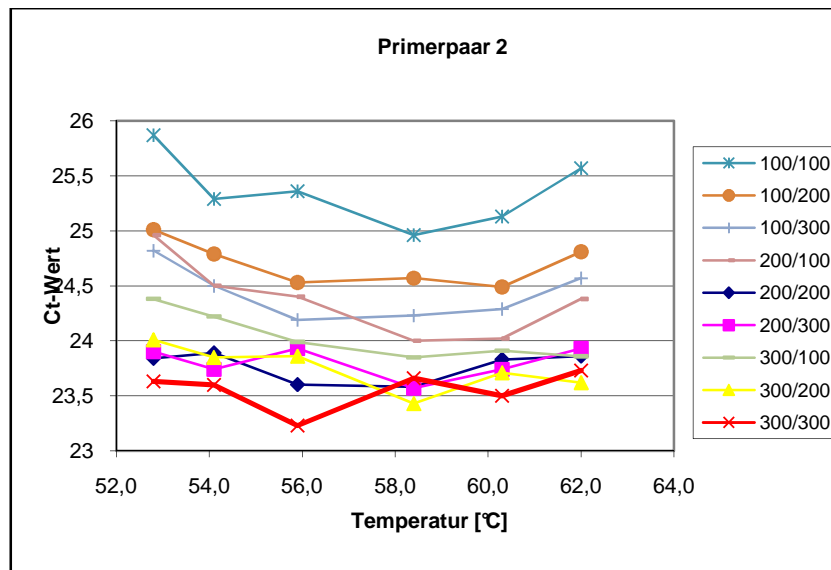


Abbildung 18: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 2

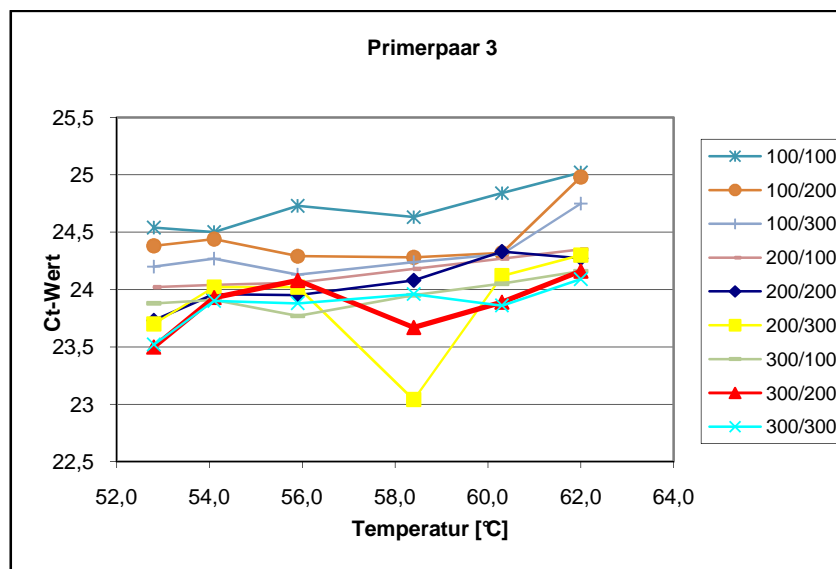


Abbildung 19: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 3

In der folgenden Tabelle sind die optimalen Primer-Konzentrationen und Annealingtemperaturen zusammengefasst, mit welchen im Anschluss weitergearbeitet wurde.

Tabelle 7: Optimierte Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen für Primerpaar 1-3

Primer	Konzentration [nM]	Annealingtemperatur [°C]	Ct-Wert
Primerpaar 1 (Agglutinin)			
Primer forward	300	56	21,41
Primer reverse	200		
Primerpaar 2 (Oleosin)			
Primer forward	300	56	23,23
Primer reverse	300		
Primerpaar 3 (Ara h 6)			
Primer forward	300	53	23,50
Primer reverse	200		

4.2.3. Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer mittels SYBR Green®-Assays

Um die Spezifität der Erdnuss-Primerpaare zu untersuchen, wurden folgende 28 Lebensmittel auf Kreuzreaktivität getestet: Lupine, weiße Bohnen, Linsen, Erbsen, Kichererbsen, Haselnüsse, Mandeln, Cashewkerne, Macadamia, Walnüsse, Paranüsse, Pekanüsse, Kürbiskerne, Sonnenblumenkerne, Pinienkerne, Pistazien, Weizen, Roggen, Dinkel, Gerste, Hafer, Reis, Mais, Sesam, schwarzer Sesam, Mohn, Leinsaat und Soja. Die DNA wurde, wie in Kap. 5.2.2. und 5.3. beschrieben, extrahiert und die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch bestimmt. Danach wurden SYBR Green®-Assays mit Schmelzpunktanalysen für jedes Primerpaar durchgeführt. Im Anschluss wurden die DNA-Amplifikate, die einen ähnlichen oder gleichen Schmelzpunkt aufwiesen wie die der Erdnuss-Positivkontrolle, auf ein Gel aufgetragen und eine Agarosegelelektrophorese vorgenommen. Der genaue Vorgang wird im Kap. 5.5.2. erläutert.

- Primerpaar 1 (Agglutinin)

Das Primerpaar 1 zeigte sowohl bei der Schmelzpunktanalyse ($T_m=84,5$) als auch bei der Agarosegelelektrophorese Kreuzreaktivität mit der Paranuss und der Pistazie (siehe Abb. 20 bis 22). Die in Pinienkernen, Walnuss und Sesam gebildeten Produkte wiesen zwar die gleiche

Schmelztemperatur auf, eine Kreuzreaktivität konnte jedoch aufgrund des Ergebnisses der Agarosegelelektrophorese ausgeschlossen werden.

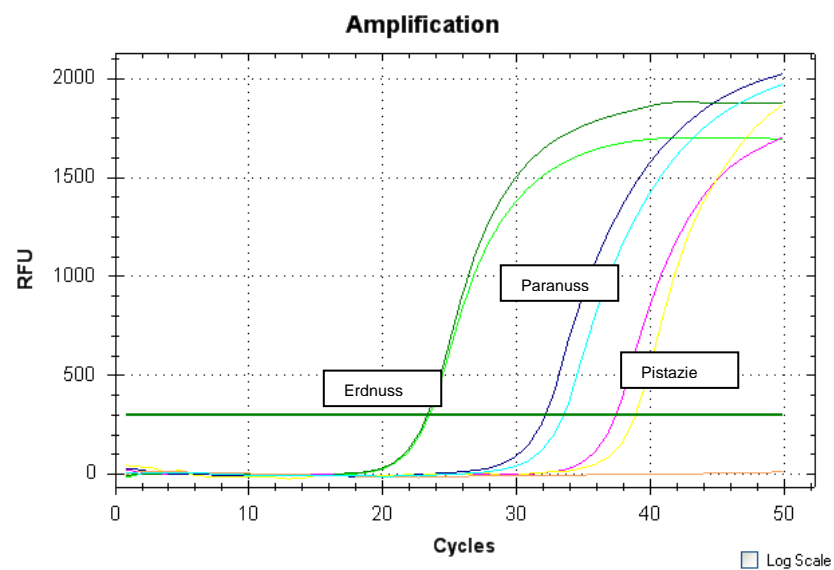


Abbildung 20: Amplifikationskurven für DNA aus Erdnuss, Paranuss und Pistazie mit Primerpaar 1

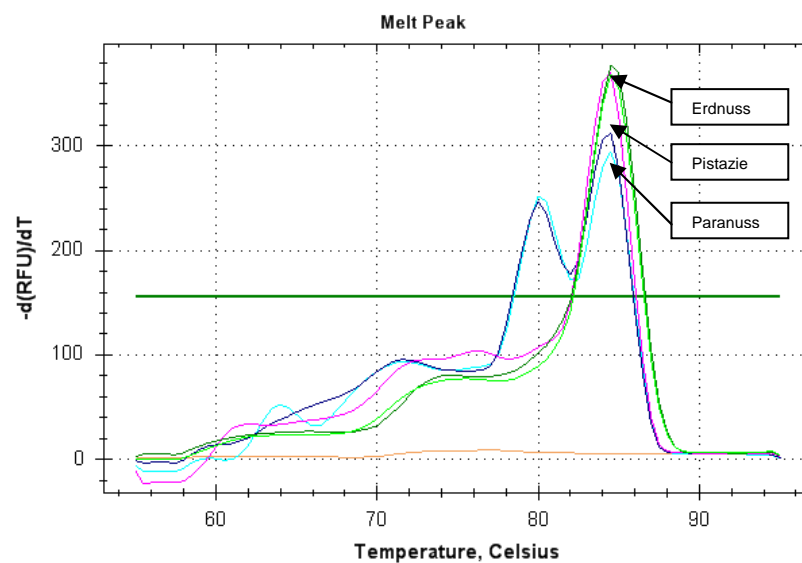


Abbildung 21: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 1 gebildeten Produkte

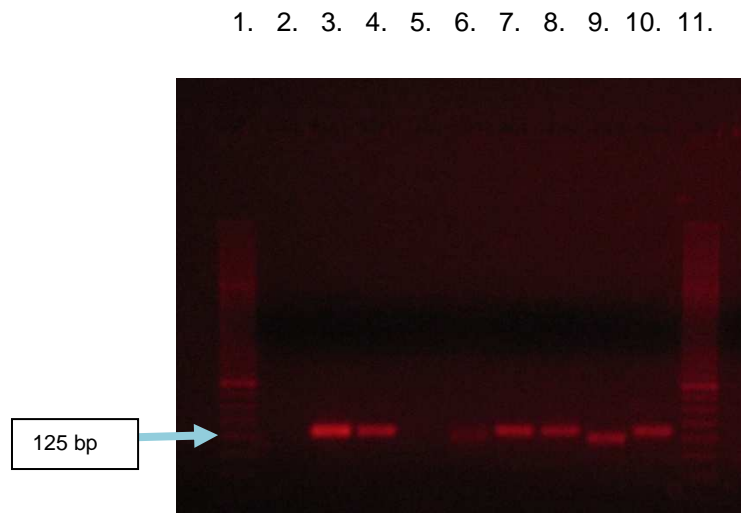


Abbildung 22: Beispiel eines Agarosegels der mit dem Primerpaar 1 gebildeten Produkte
 1. Längenmarker, 2. neg. Kontrolle, 3. & 4. Erdnuss, 5. & 6. Haselnuss, 7. & 8. Pistazie, 9.&10. Paranuss,
 11. Längenmarker

- Primerpaar 2 (Oleosin)

Mit dem Primerpaar 2 wurden in Hafer, Mais, Walnuss und Paranuss Produkte gebildet, die eine gleiche Schmelztemperatur wie die Erdnuss-Positivkontrolle ($T_m=86-86,5$) aufwiesen, eine Kreuzreaktivität konnte jedoch mittels Agarosegelelektrophorese ausgeschlossen werden. Bei Sonnenblumenkernen konnte selbst nach wiederholter Analyse verschiedener DNA-Extrakte eine Kreuzreaktivität nicht eindeutig ausgeschlossen werden – die Produkte hatten eine ähnliche Schmelztemperatur (siehe Abb. 23) und am Agarosegel wurden mehrere nicht-eindeutige Banden erhalten. Im TaqMan®-Assay (siehe Abb. 25, Kap. 4.2.5.) wurde jedoch kein Signalanstieg beobachtet.

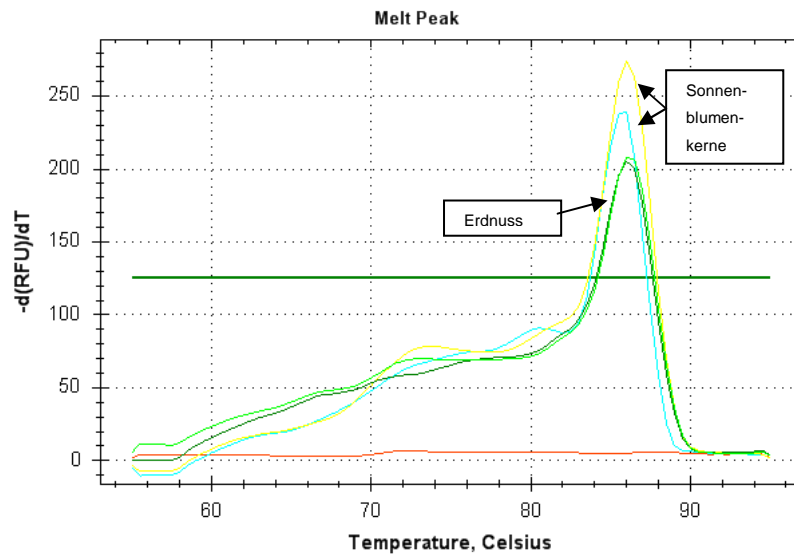


Abbildung 23: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 2 erhaltenen Produkte

- Primerpaar 3 (Ara h 6)

Mit dem Primerpaar 3 wurden zuerst die Leguminosen getestet, mit diesen konnte eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden. Bei weiteren Tests trat eine Kontamination des Primerpaares auf. Da dieses Primerpaar außerdem zur Dimerbildung neigte, wurden keine weiteren Versuche gemacht.

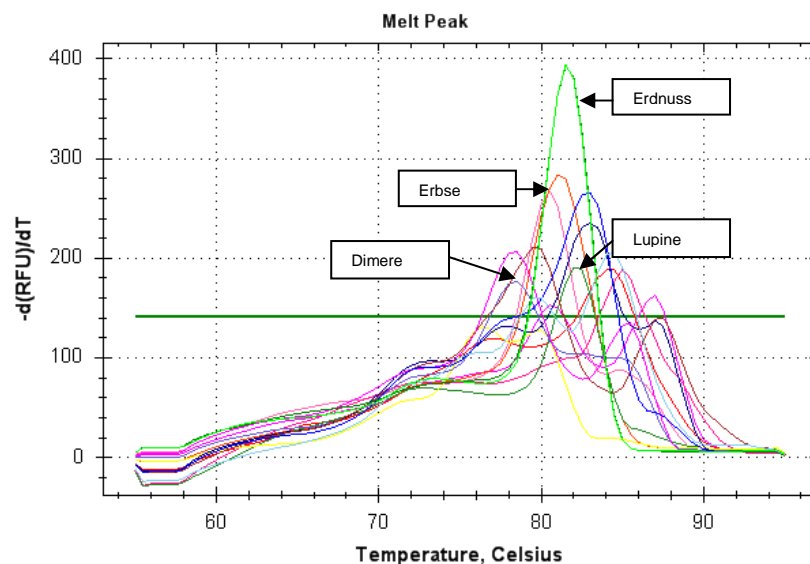


Abbildung 24: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 3 erhaltenen Produkte

Primerpaar 1 wurde aufgrund der Kreuzreaktivität zu Paranuss und Pistazie ausgeschlossen, Primerpaar 3 aufgrund der Kontamination mit

Erdnuss-DNA und ihrer Neigung zur Dimerbildung. Die weiteren Versuche wurden daher mit Primerpaar 2 durchgeführt.

4.2.4. Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration des TaqMan®-Assays

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Sondenkonzentrationen von 10 bis 200 nM für den TaqMan®-Assay getestet. Die vollständige Versuchsbeschreibung ist in Kap. 5.5.3. zu finden.

Es wurde jene Konzentration ausgewählt, die den niedrigsten Ct-Wert lieferte. Die folgende Tabelle zeigt eine Aufstellung der getesteten Konzentrationen und der erhaltenen Ct-Werte.

Tabelle 8: Aufstellung der getesteten Erdnuss-Sondenkonzentrationen mit den zugehörigen Ct-Werten

Sondenkonzentration [nM]	Ct1-Wert	Ct2-Wert	MW (Ct-Werte)
10	26,79	26,47	26,63
25	25,82	25,94	25,88
50	26,25	25,89	26,07
75	25,93	25,78	25,86
100	26,21	25,84	26,03
200	26,29	26,69	26,49

Die Sonden-Konzentration von 75 nM lieferte die niedrigsten Werte und wurde daher für die weiteren Versuche eingesetzt.

4.2.5. Bestimmung der Kreuzreaktivität des TaqMan®-Assays

Nach Optimierung der TaqMan®-Sonden-Konzentration wurde die Spezifität des TaqMan®-Assays getestet. Die Proben, für die Schmelzpunktanalyse und Agarosegelelektrophorese kein eindeutiges Ergebnis geliefert hatten (Sonnenblumenkerne, Pekanuss), wurden auf Kreuzreaktivität getestet. Die Durchführung dieses TaqMan®-Assays wird in Kap. 5.5.4. erklärt.

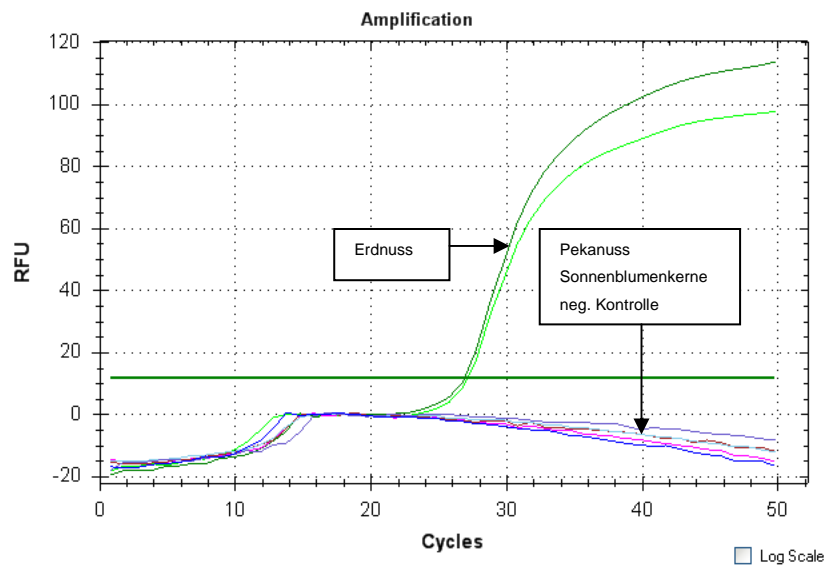


Abbildung 25: Amplifikationskurven für die DNA aus Erdnuss, Pekanuss und Sonnenblumenkernen im TaqMan®-Assay

Im TaqMan®-Assay konnte eine Kreuzreaktivität des Primerpaares 2 mit Pekanuss und Sonnenblumenkernen ausgeschlossen werden.

4.2.6. Erstellen einer Standardkurve und Ermittlung der Effizienz

Ausgehend von einer 20 ng/μl konzentrierten Erdnuss-DNA-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100 000 erstellt. Mit dieser Standardreihe wurde ein TaqMan®-Assay durchgeführt und die Amplifikationseffizienz bestimmt. Die genaue Vorgehensweise wird in Kap. 5.5.5. erörtert.

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Verdünnung auch die Ct-Werte zunahmen. Bis zu einer Verdünnung von 1:1000 konnte die Erdnuss-DNA problemlos detektiert werden. Bei der 1:10 000 Verdünnung wurde im 3-fachen Ansatz zweimal ein positives Ergebnis und einmal ein negatives Ergebnis erhalten. Die 1:100 000 verdünnte Erdnuss-DNA konnte nicht mehr detektiert werden. Mit der entwickelten Real Time PCR-Methode können daher 2 pg/μl bzw. 10 pg absolut der Erdnuss-DNA nachgewiesen werden.

Zum Erstellen der Standardfunktion wurden die Ct-Werte gegen den Logarithmus der Anfangsmenge an Erdnuss-DNA in ng aufgetragen. Die so ermittelte Gerade zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0,992, und die aus der Steigung berechnete Effizienz betrug 91,8% (siehe Abb. 26).

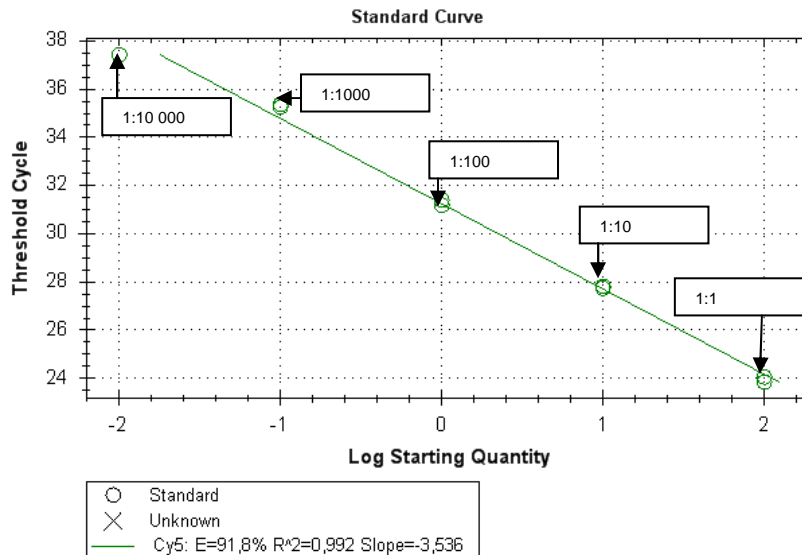


Abbildung 26: Standardkurve für seriell verdünnte Erdnuss-DNA (Log Starting Quantity in ng)

4.3. Entwicklung einer Real Time-Duplex-PCR-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Erdnuss

Nach Entwicklung des Singleplex-Assays zur Bestimmung von Erdnuss wurde dieser mit einer in unserer Arbeitsgruppe entwickelten PCR-Methode zur Detektion von Sesam in Lebensmitteln kombiniert.

Zur Bestimmung des Sesams wurde ein Molecular Beacon-Assay entwickelt und für die Detektion wurde das Gen, welches für das Hauptallergen Ses i 1 codiert, verwendet. Die verwendeten Primer zeigten keine Kreuzreaktivität zu 17 getesteten Lebensmitteln bzw. Lebensmittelzutaten. Die Effizienz seriell verdünnter Sesam-DNA (1:1 bis 1: 100 000) betrug 100,3 %.

In weiterer Folge wurde ein Duplex-Assay zur Detektion von Sesam und Haselnuss in Lebensmitteln entwickelt, wobei hierbei eine TaqMan®-Sonde verwendet wurde. Die Effizienzen im optimierten Duplex-Assay betrugen für seriell verdünnte Sesam- und Haselnuss-DNA 103,7% und 96,4%.

Da im Singleplex-Assay ein Molecular Beacon und im Duplex-Assay die TaqMan®-Sonden angewandt wurden, wurden zur Entwicklung des Duplex-Assays zur Detektion von Erdnuss und Sesam die optimierten Sesam-Primer- und Sondenkonzentrationen aus dem Duplex-Assay für Sesam und Haselnuss übernommen. Die Annealingtemperaturen des Erdnuss-Singleplex-Assays (56°C) und des Duplex-Assays für Sesam und Haselnuss (54°C) unterschieden sich nur geringfügig. Im Erdnuss-Singleplex-Assay wurden bei 54°C jedoch höhere Ct-Werte beobachtet, daher wurde die Annealingtemperatur aus dem optimierten Singleplex-Assay für Erdnuss übernommen.

Tabelle 9: Verwendete Primer- und Sonden-Konzentrationen im Duplex-Assay

	Konzentration
Erdnuss-Primer forward	300 nM
Erdnuss-Primer reverse	300 nM
Erdnuss-Sonde	75 nM
Sesam-Primer forward	50 nM
Sesam-Primer reverse	50 nM
Sesam-Sonde	200 nM

Tabelle 10: Temperaturprogramm des Duplex-Assays

Zyklen	Dauer	Temperatur [°C]
1x	3 min	95
45x	10 sec	95
	40 sec	56
	11 sec	72

4.3.1. Entwicklung des Duplex-Assays

Zum Testen des Duplex-Assays (Bedingungen des Duplex-Assays siehe Kap. 5.5.6.) wurden 3 Mischungen mit unterschiedlichen Anteilen an Erdnuss- bzw. Sesam-DNA hergestellt (Zusammensetzung siehe Tab. 11)

und ein Duplex-Assay durchgeführt. Die vollständige Beschreibung der Durchführung ist in Kap. 5.5.8. zu finden.

Die erhaltenen Amplifikationskurven sind in den Abb. 27 und 28 dargestellt.

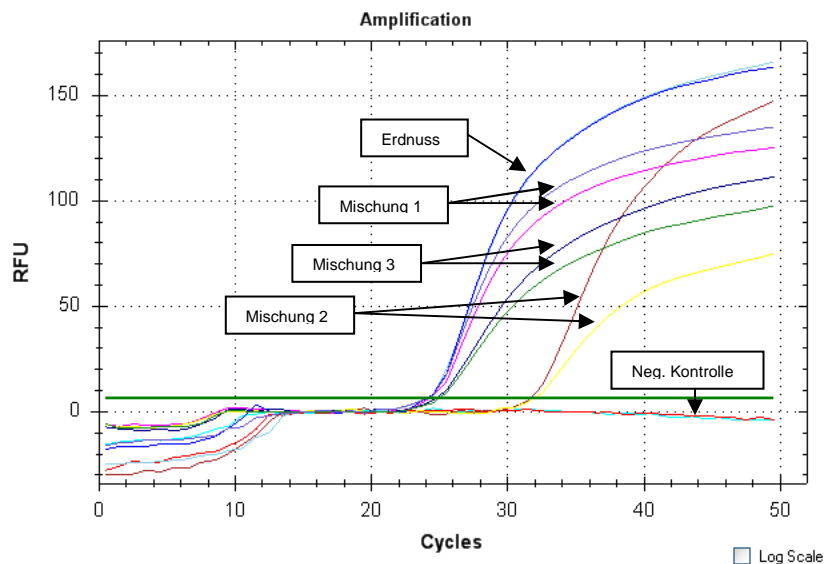


Abbildung 27: Amplifikationskurven des Duplex-Assays für Erdnuss

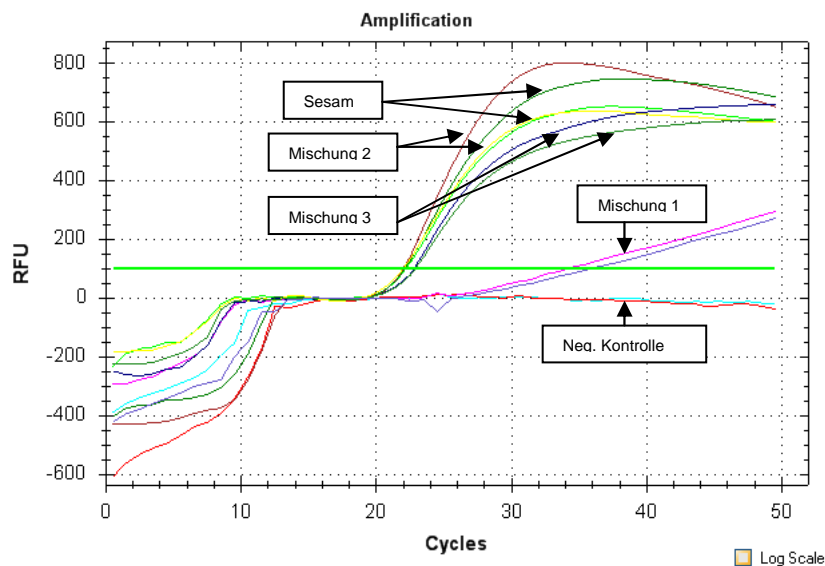


Abbildung 28: Amplifikationskurven des Duplex-Assays für Sesam

Es wurde beobachtet, ob sich Sesam-DNA neben einem Überschuss an Erdnuss-DNA amplifizieren lässt und umgekehrt.

Die Erdnuss-DNA konnte in allen 3 Mischungen reproduzierbar nachgewiesen werden, wobei mit abnehmender Konzentration die Ct-Werte höher wurden. Sämtliche Kurven zeigten einen sigmoiden Verlauf.

Auch die Sesam-DNA konnte in allen 3 Mischungen amplifiziert werden, wobei auch hier die Ct-Werte mit abnehmender Konzentration stiegen. In der Mischung 1 (1% Sesam-DNA, 99%Erdnuss-DNA))konnte die Sesam-DNA zwar noch detektiert werden, es wurde jedoch eine Streuung der Ct-Werte und ein nicht sigmoider Verlauf der Kurven beobachtet.

In Tab. 11 sind die im Duplex-Assay erhaltenen Ct-Werte zusammengestellt.

Tabelle 11: Auflistung der Ct-Werte für die Mischungen 1-3 im Duplex-Assay

	Erdnuss-DNA (V/V%)	Sesam-DNA (V/V%)	Erdnuss			Sesam		
			Ct1	Ct2	MW(Ct)	Ct1	Ct2	MW(Ct)
Mischung 1	99	1	24,41	24,34	24,38	35,61	37,65	36,63
Mischung 2	1	99	31,76	32,13	31,95	22,18	22,23	22,21
Mischung 3	50	50	24,88	25,12	25,00	23,00	23,14	23,07
Positivkontrolle	100	0	24,27	24,25	24,26			
Positivkontrolle	0	100				22,44	22,34	22,39

4.3.2. Erstellen von Standardfunktionen und Ermittlung der Effizienz

Es wurde sowohl für den Sesam als auch für die Erdnuss eine Standardfunktion erstellt. Dazu wurde je ein DNA-Extrakt der Erdnuss und des Sesams mit einer Konzentration von 20 ng/µl von 1:10 bis 1:100 000 verdünnt. Im Anschluss wurde ein Duplex-Assay durchgeführt und jeweils die Standardfunktionen ermittelt (siehe Kap. 5.5.7.).

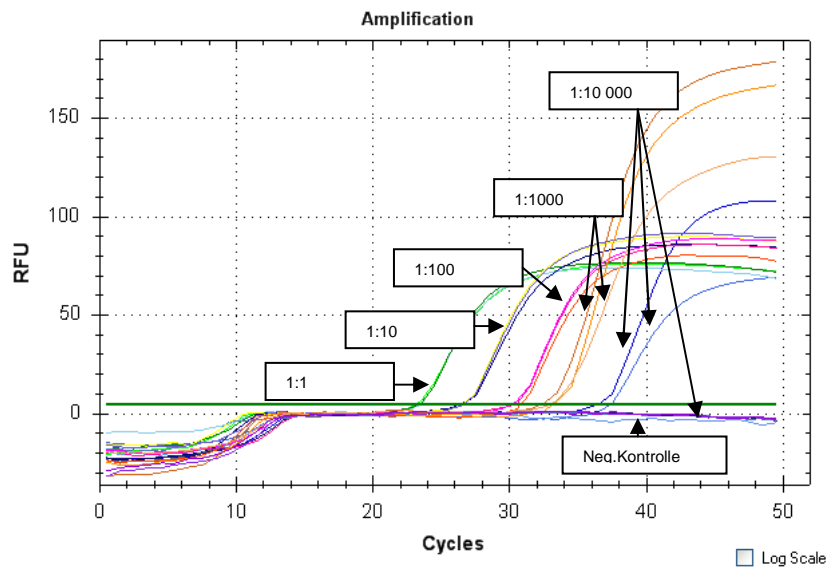


Abbildung 29: Amplifikationskurven für seriell verdünnte Erdnuss-DNA im Duplex-Assay

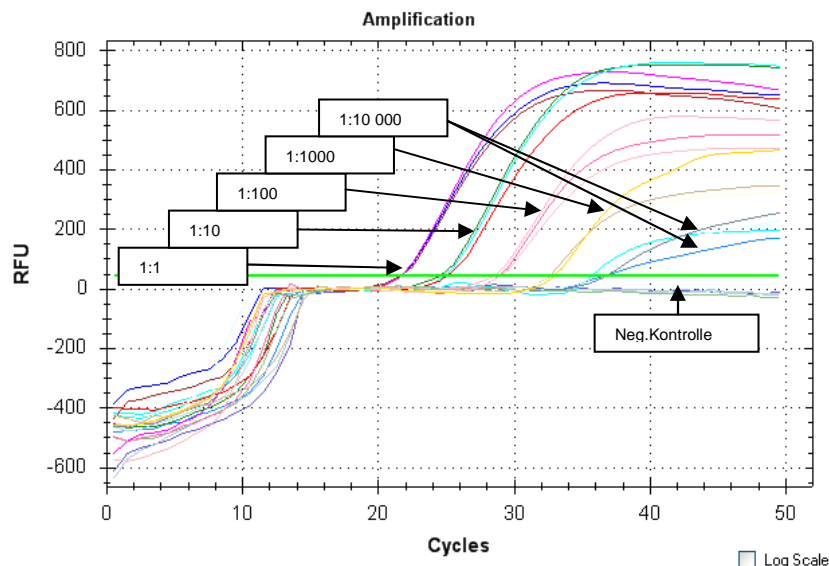


Abbildung 30: Amplifikationskurven für seriell verdünnte Sesam-DNA im Duplex-Assay

Die Sesam-DNA konnte bis zu einer Verdünnung von 1:10 000 detektiert werden, die 1:100 000 Verdünnung führte zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Der entwickelte Duplex-Assay kann Sesam-DNA bis zu einer Konzentration von 2 pg/µl bzw. 10 pg absolut nachweisen.

Die Erdnuss-DNA konnte bis zu einer Verdünnung von 1:1000 problemlos nachgewiesen werden. Bei der 1:10 000 Verdünnung wurde in 5 von 7 Messungen ein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet. Bei einer Verdünnung von 1:100 000 wurde kein positives Signal erhalten.

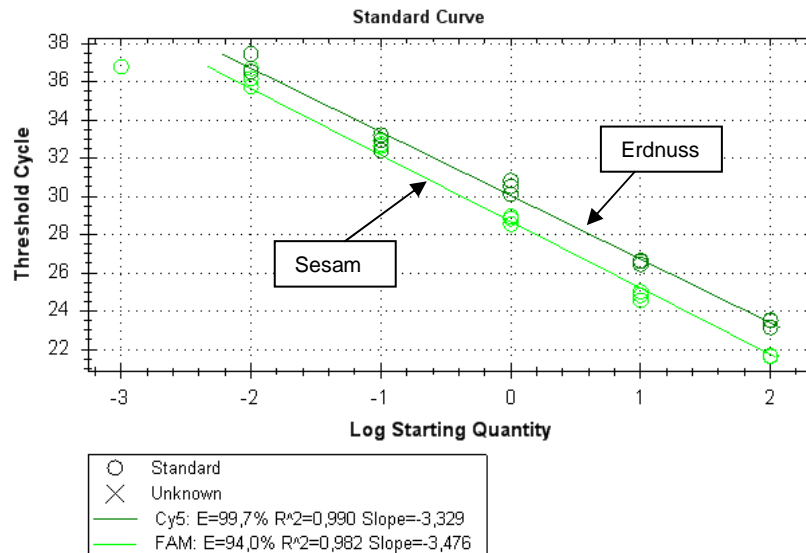


Abbildung 31: Standardfunktionen für seriell verdünnte Sesam- und Erdnuss-DNA im Duplex-Assay (Log Starting Quantity in ng)

Die Amplifikationseffizienz für die Erdnuss betrug 99,7% bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,990$, für Sesam betrug die Effizienz 94,0% bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,982$. (siehe Abb. 31)

4.3.3. Optimierung des Duplex-Assays

Das vorrangige Ziel der Optimierung war es eine, sigmoide Amplifikationskurve für Sesam bei einem Überschuss an Erdnuss-DNA zu erhalten und des Weiteren eine niedrigere Nachweisgrenze für Erdnuss bei einem Überschuss an Sesam-DNA zu erreichen.

Die Optimierung des Duplex-Assays wurde mit den Mischungen 1 und 2 (1% Sesam-, 99% Erdnuss-DNA bzw. 1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) aus Kap. 5.5.8. durchgeführt. Das Prozedere der Optimierung wird in Kap. 5.5.9. beschrieben.

- Erhöhung der Sesam-Primerkonzentrationen

Im nicht optimierten Duplex-Assay wurde eine Sesam-Primerkonzentration von 50 nM verwendet.

Für die Detektion von Sesam in der Mischung 2 (99% Sesam-DNA) brachte eine Erhöhung der Sesam-Primerkonzentration keine

Veränderung des Ct-Wertes, jedoch eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Bei der Mischung 1 (1% Sesam-DNA) wurden bei höheren Primerkonzentrationen niedrigere Ct-Werte erhalten, das Fluoreszenzsignal wurde höher, aber die Kurven zeigten keinen sigmoiden Verlauf. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 32, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 34 gezeigt.

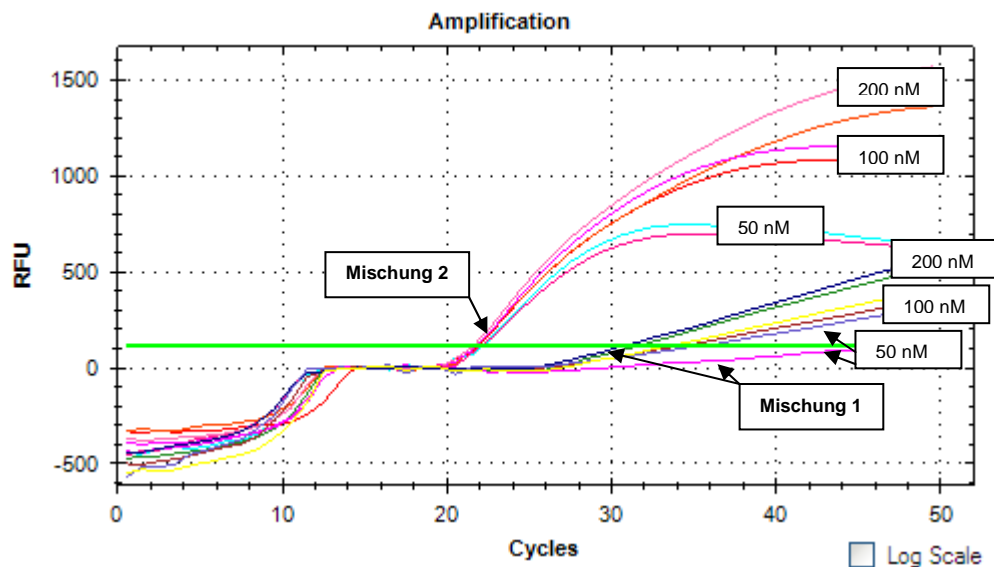


Abbildung 32: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Sesam-Primerkonzentrationen

Eine Erhöhung der Sesam-Primerkonzentrationen führte kaum zu einer Veränderung der Ct-Werte und der Signalthöhe bei der Detektion der Erdnuss in Mischung 1 (99% Erdnuss-DNA), jedoch zu einer deutlichen Verschlechterung bei Mischung 2 (1% Erdnuss-DNA). Mit zunehmender Primerkonzentration stiegen die Ct-Werte und die Kurven waren nicht mehr sigmoid. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 33, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 34 gezeigt.

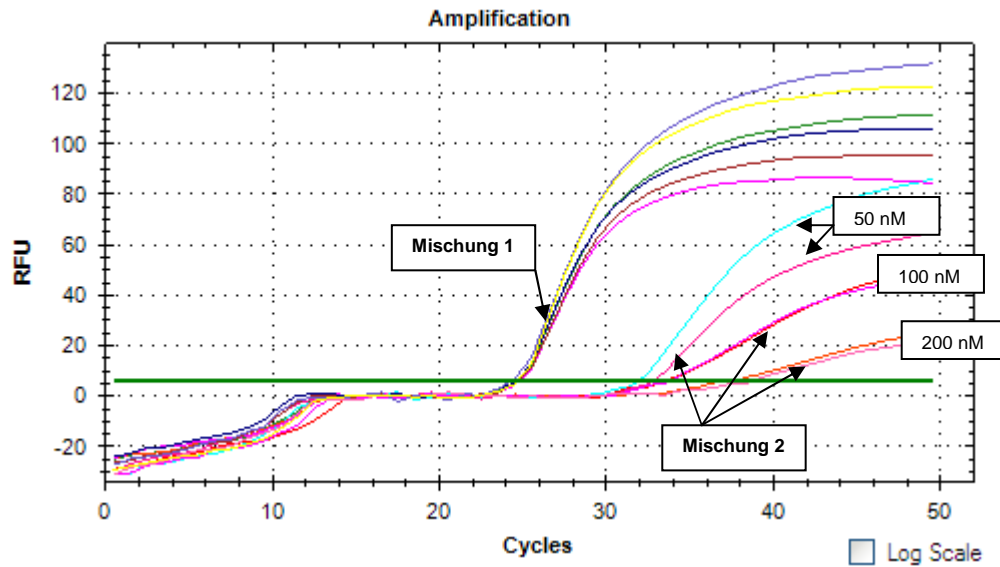


Abbildung 33: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Sesam-Primerkonzentrationen

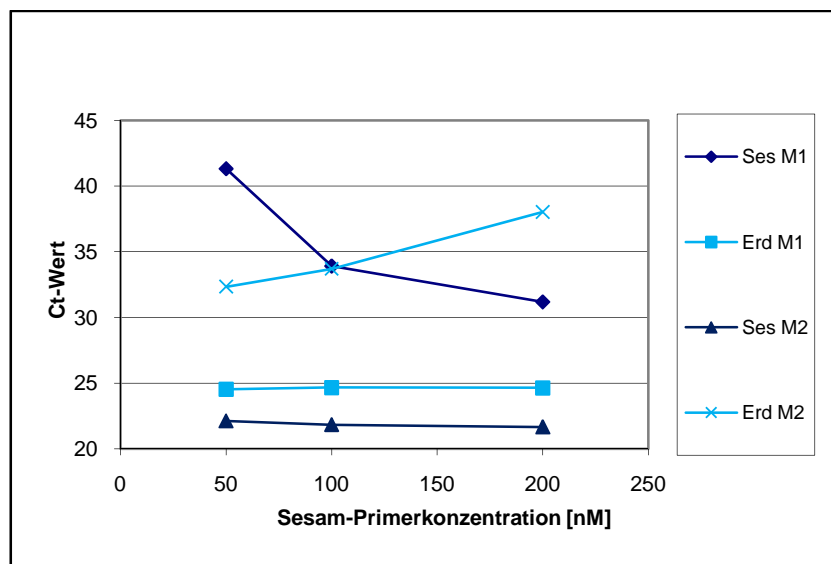


Abbildung 34: Einfluss der Sesam-Primerkonzentration auf die Detektion von Erdnuss-DNA und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)

Da bei einer Erhöhung der Sesam-Primerkonzentrationen keine sigmoiden Amplifikationskurven für Sesam bei einem Überschuss an Erdnuss-DNA erzielt wurden und einen Anstieg der Ct-Werte für die Erdnuss zur Folge hatten, wurde in den weiteren Versuchen eine Sesam-Primerkonzentration von 50 nM verwendet.

- Erniedrigung der Erdnuss-Primerkonzentrationen

Im nicht optimierten Duplex-Assay wurde eine Erdnuss-Primerkonzentration von 300 nM verwendet.

Bei der Detektion von Erdnuss führten Primerkonzentrationen von 100 nM und niedriger bei der Mischung 1 (99% Erdnuss-DNA) zu einer Erhöhung der Ct-Werte und zu einer Erniedrigung des Signals. Auch bei der Mischung 2 (1% Erdnuss-DNA) nahm das Signal mit abnehmender Primerkonzentration ab und war bei einer Konzentration von 50 nM fast nicht mehr vom Hintergrundsignal zu unterscheiden. Bei Primerkonzentrationen von 300 und 200 nM blieben die Ct-Werte bei der Mischung 2 annähernd gleich, und nahmen bei Konzentrationen von 100 und 50 nM zu. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 35, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 37 gezeigt.

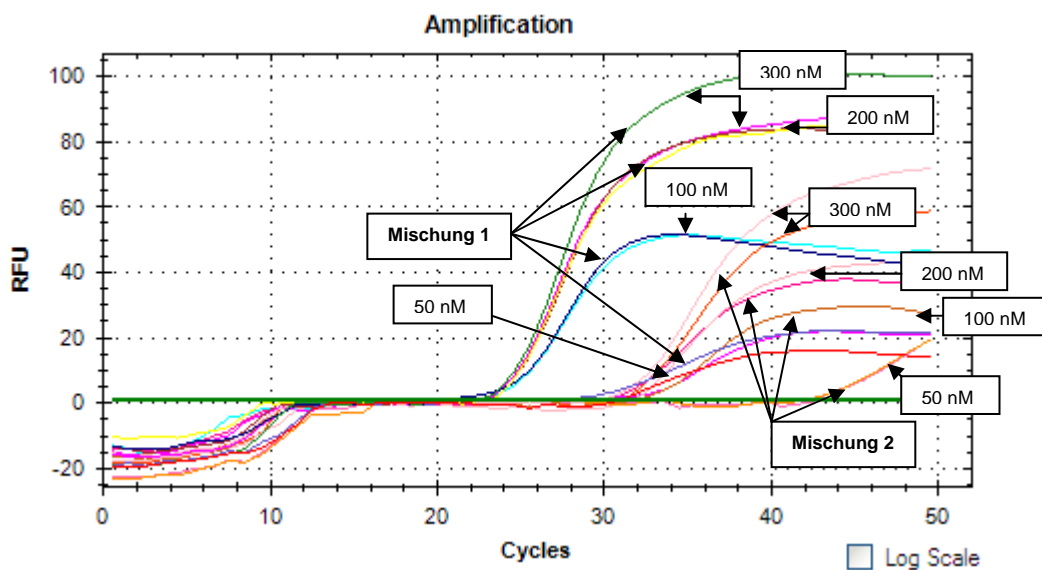


Abbildung 35: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Erdnuss-Primerkonzentrationen

Für die Detektion von Sesam hatte die Erniedrigung der Erdnuss-Primerkonzentration keine Änderung der Ct-Werte und der Signalthöhe bei Mischung 2 (99% Sesam-DNA) zur Folge. Bei der Mischung 1 (1% Sesam-DNA) war eine deutliche Verbesserung durch die Erniedrigung der Primerkonzentration festzustellen. Die Ct-Werte wurden niedriger, das

Signal höher und bei einer Konzentration von 50 nM wurde für Mischung 1 eine sigmoide Kurve erhalten. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 36, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 37 gezeigt.

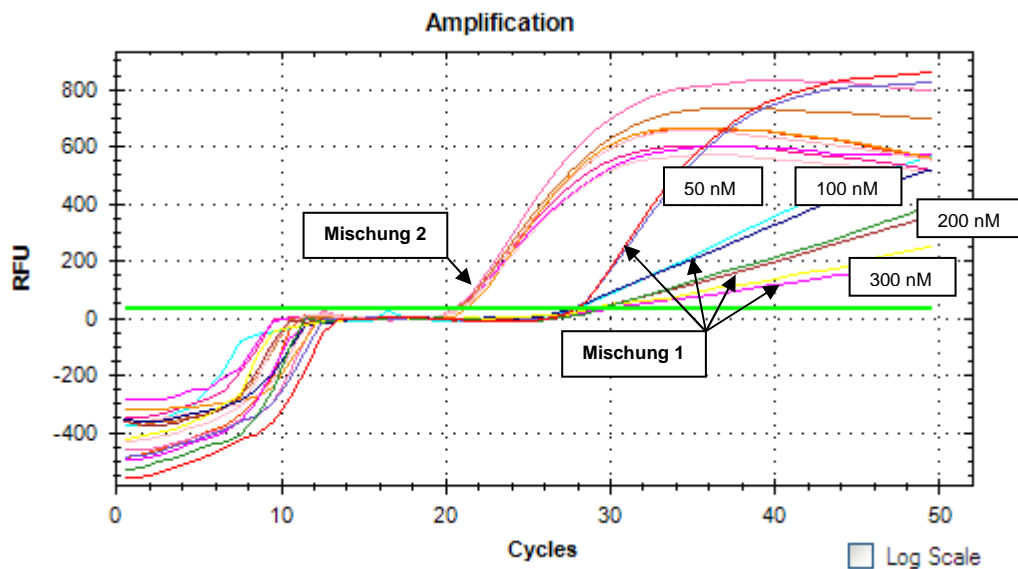


Abbildung 36: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Erdnuss-Primerkonzentrationen

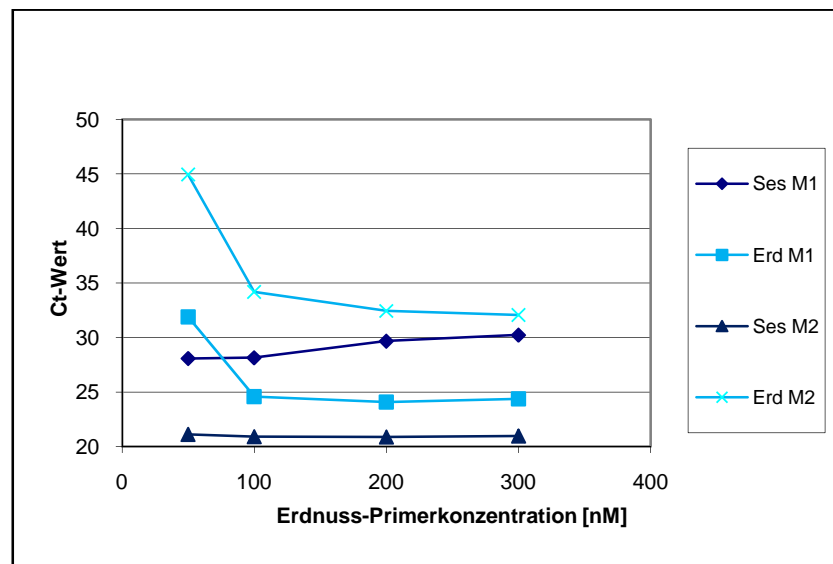


Abbildung 37: Einfluss der Erdnuss-Primerkonzentration auf die Detektion von Erdnuss- und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)

Da aber bei einer Erdnuss-Primerkonzentration von 50 nM eine deutliche Verschlechterung bei der Detektierbarkeit der Erdnuss-DNA in beiden

Mischungen auftrat, wurde in den weiteren Versuchen eine Erdnuss-Primerkonzentration von 300 nM weiterverwendet

- Erniedrigung der Sesam- Sondenkonzentration

Im nicht optimierten Duplex-Assay wurde eine Sondenkonzentration von 200 nM verwendet.

Durch Erniedrigung der Sesam-Sondenkonzentration wurden die Ct-Werte und die Signalhöhe beim Sesam leicht verbessert. Für die Detektion von Sesam in Mischung 1 (1% Sesam-DNA) ließ sich eine deutliche Herabsetzung des Ct-Wertes bei einer Sondenkonzentration von 25 nM feststellen, es wurden jedoch keine sigmoiden Amplifikationskurven erhalten. Bei Sesam-Sondenkonzentrationen von 50 und 100 nM ergaben niedrige Fluoreszenzsignale und Ct-Werte > 40. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 38, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 40 gezeigt.

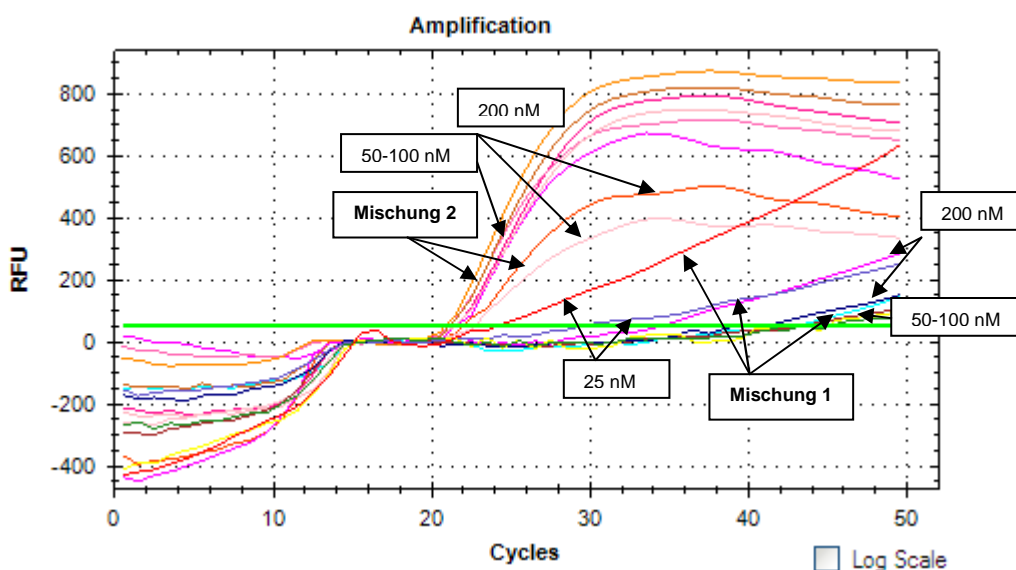


Abbildung 38: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Sesam-Sondenkonzentrationen

Bei einer Erniedrigung der Sesam-Sondenkonzentration kam es zu keiner Veränderung der Ct-Werte oder der Signalhöhe bei der Detektion von Erdnuss in Mischung 1 (99% Erdnuss-DNA). Bei Mischung 2 (1% Erdnuss) blieben die Ct-Werte und die Signalhöhe bei 100 und 200 nM

unverändert. Bei 50 und 25 nM zeigte sich eine leichte Erhöhung der Ct-Werte und eine Erniedrigung des Fluoreszenzsignals. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 39, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 40 gezeigt.

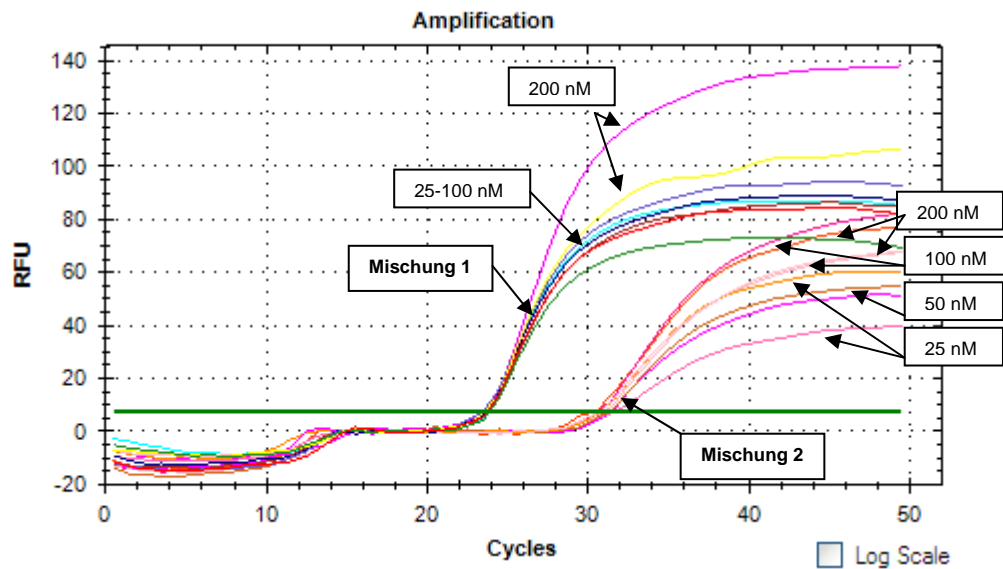


Abbildung 39: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Sesam-Sondenkonzentrationen

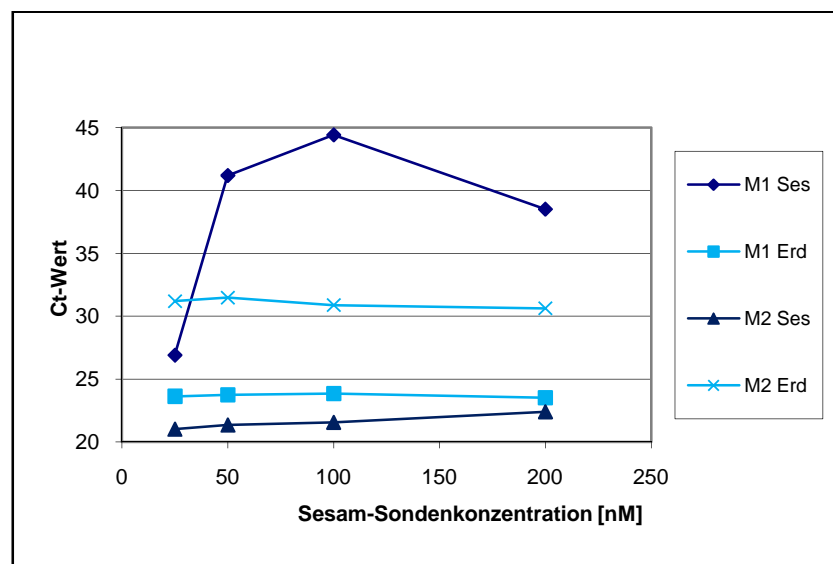


Abbildung 40: Einfluss der Sesam-Sondenkonzentration auf die Detektion von Erdnuss- und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)

Da bei einer Sesam-Sondenkonzentration von 25 nM zwar für Sesam bessere Ergebnisse bezüglich der Ct-Werte und der Signalhöhe erreicht wurden, die Kurven jedoch weiterhin keinen sigmoiden Verlauf zeigten,

wurde in den weiteren Versuchen die Sesam-Sondenkonzentration von 200 nM weiterverwendet.

- Erniedrigung der Erdnuss-Sondenkonzentration

Da der Erdnuss Singleplex-Assay bereits bezüglich der Erdnuss-Sondenkonzentration optimiert worden war, und bei Konzentrationen von 25 und 75 nM die besten Ergebnisse erzielt wurden, wurde hier getestet, ob eine Sondenkonzentration von 25 nM im Vergleich zur bisher verwendeten Konzentration von 75 nM die Amplifikation von Sesam-DNA im Duplex-Assay verbessern würde.

Eine Erniedrigung der Erdnuss-Sondenkonzentration von 75 nM auf 25 nM brachte ein etwas höheres Fluoreszenzsignal bei annähernd gleichbleibenden Ct-Werten für die Erdnuss in der Mischung 1 (99% Erdnuss-DNA). Bei der Mischung 2 (1% Erdnuss-DNA) zeigte sich ein höheres Signal und ein etwas niedrigerer Ct-Wert. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 41, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 43 gezeigt.

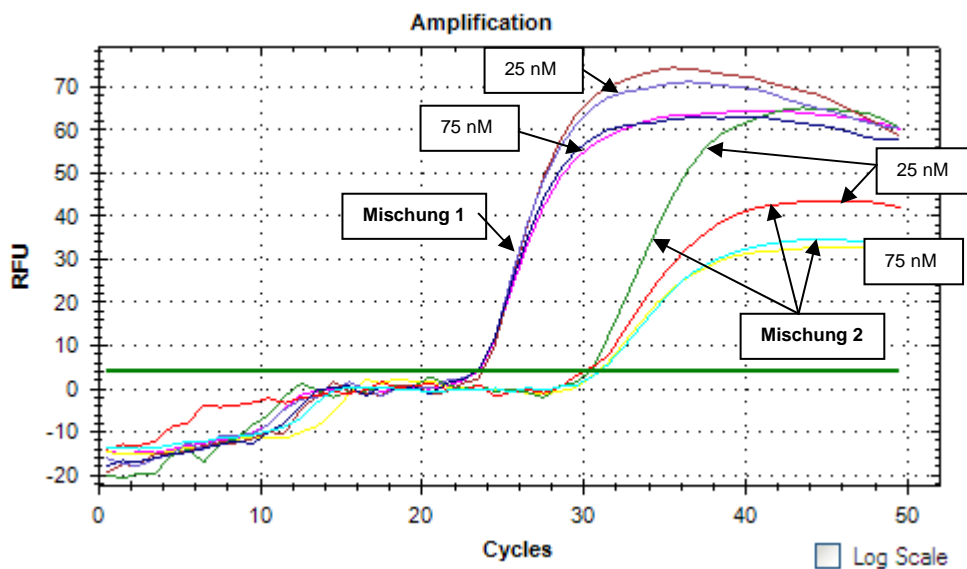


Abbildung 41: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Erdnuss-Sondenkonzentrationen

Auch bei der Detektion von Sesam zeigte sich bei Mischung 2 (99% Sesam-DNA) durch die Erniedrigung ein etwas höheres Fluoreszenzsignal

bei gleichbleibenden Ct-Werten. Bei Mischung 1 (1% Sesam-DNA) war die Signalhöhe gleich, der Ct-Wert jedoch höher und in beiden Fällen waren die Amplifikationskurven nicht sigmoid. Die zugehörigen Amplifikationskurven werden in Abb. 42, der Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Ct-Werte wird in Abb. 43 gezeigt.

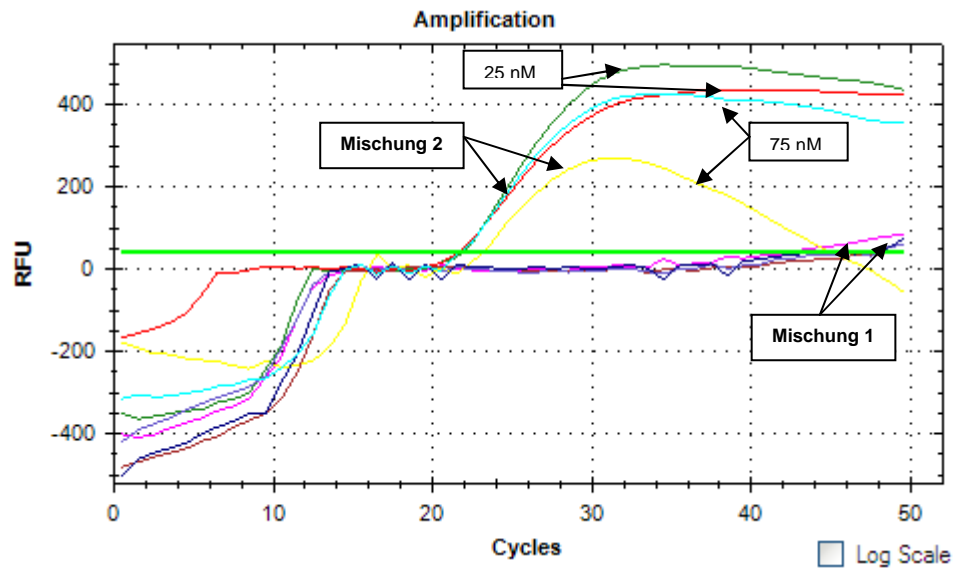


Abbildung 42: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Erdnuss-Sondenkonzentrationen

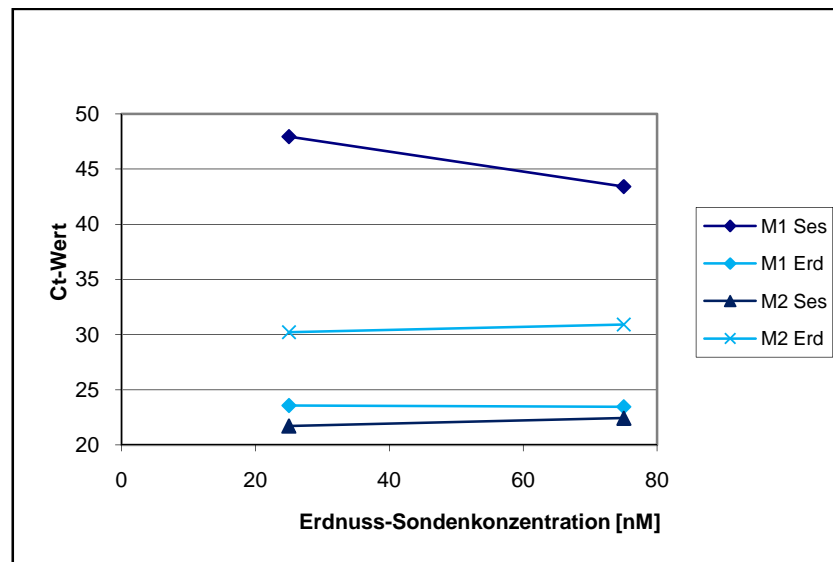


Abbildung 43: Einfluss der Erdnuss-Sondenkonzentration auf die Detektion von Erdnuss und Sesam in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)

Eine Erniedrigung der Erdnuss-Sondenkonzentration brachte keine wünschenswerte Verbesserung, daher wurde eine Sondenkonzentration von 75 nM in den weiteren Versuchen verwendet.

Da keine der vier Optimierungsversuche eine deutliche Verbesserung der Amplifikationskurven für Sesam bei einem Überschuss an Erdnuss brachten bzw. bei Verbesserungen dieser Kurven sich deutliche Verschlechterungen für die Amplifikationskurven für Erdnuss bei einem Überschuss an Sesam-DNA ergaben, wurden die ursprünglichen Konzentrationen beibehalten. Die folgende Tabelle zeigt eine Aufstellung der in den weiteren Duplex-Assays verwendeten Konzentrationen.

Tabelle 12: Verwendete Primer- und Sondenkonzentrationen des Duplex-Assays

Erdnuss-Primer forward	300 nM
Erdnuss-Primer reverse	300 nM
Erdnuss-Sonde	75 nM
Sesam-Primer forward	50 nM
Sesam-Primer reverse	50 nM
Sesam-Sonde	200 nM

4.3.4. Bestimmung der Nachweisgrenze von Erdnuss und Sesam in gespikten Lebensmitteln

Es wurden zwei unterschiedliche Matrices, die zuvor auf den Inhalt von Sesam und Erdnuss negativ getestet wurden (Grissini und Zwieback), wie in Kap. 5.1.2. und 5.6. beschrieben, mit Sesam und Erdnuss gespikt (jeweils von 1 bis 0,001%). Die DNA wurde extrahiert und die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch ermittelt. Angaben zu den DNA-Konzentrationen sowie zu den Reinheiten der Extrakte befinden sich in Kap. 4.1.2.

Im Anschluss wurde der Duplex-Assay durchgeführt und die Effizienz, der Korrelationskoeffizient sowie die Nachweisgrenze bestimmt.

4.3.4.1. Zwieback

Im gespikten Zwieback konnten sowohl die Erdnuss als auch der Sesam in Konzentrationen bis 0,005% problemlos nachgewiesen werden, dies entspricht einer Konzentration von 50 mg/kg oder 50 ppm. Die Amplifikationseffizienz betrug für die Erdnuss 94,57%, bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,973$ und für Sesam betrug die Effizienz 83,18%, bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,985$ (siehe Tab. 13, Abb. 44 und 45).

Tabelle 13: Ct-Werte und Effizienz für mit Sesam und Erdnuss gespikten Zwieback

	Sesam			Erdnuss		
	Ct1	Ct2	Ct(MW)	Ct1	Ct2	Ct(MW)
Pos.Kontrolle	22,93	22,62	22,78	25,70	25,23	25,47
Spikelevel [%]						
1	27,00	26,95	26,98	29,82	29,92	29,87
0,5	27,72	27,56	27,64	30,97	30,75	30,86
0,1	29,62	29,74	29,68	32,87	32,66	32,77
0,05	31,29	31,78	31,54	34,21	34,46	34,34
0,01	33,60	35,73	34,67	35,97	39,20	37,59
0,005	34,85	35,59	35,22	37,14	37,13	37,14
0,001	-	-	-	-	-	-
Effizienz [%]			83,18			94,57

- Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals

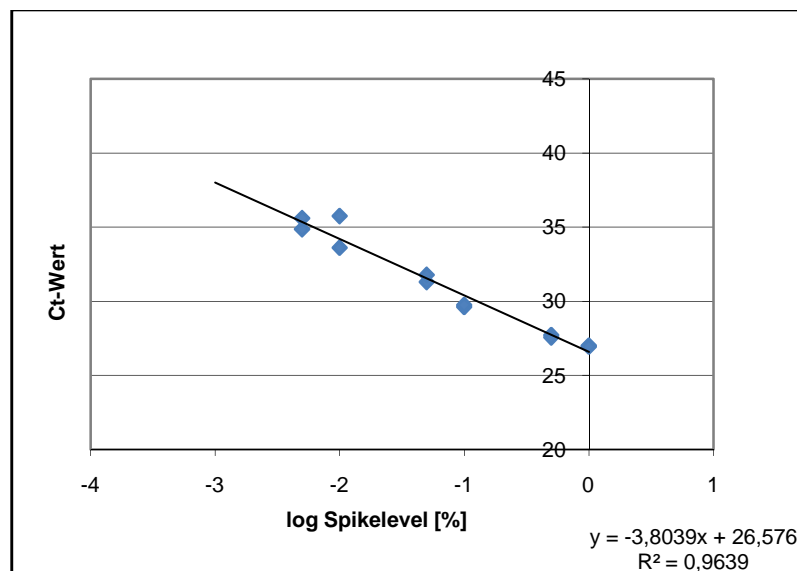


Abbildung 44: Standardfunktion für Sesam in gespiktem Zwieback

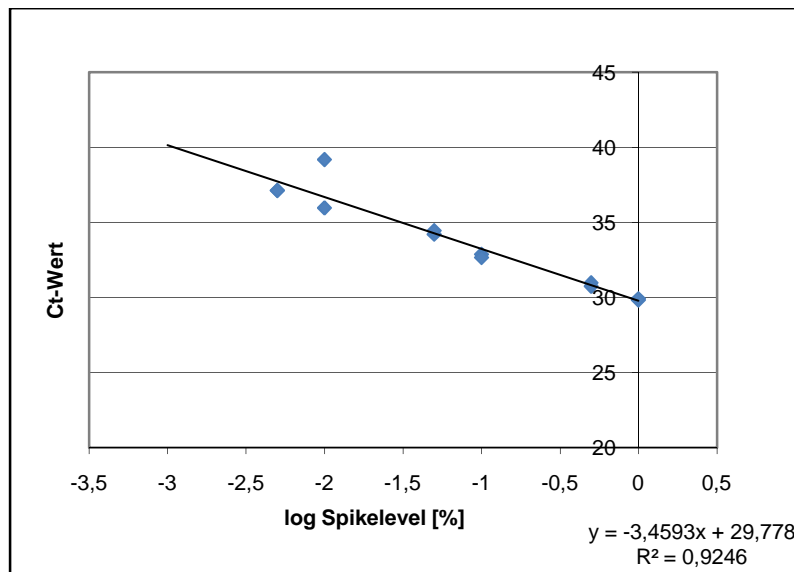


Abbildung 45: Standardfunktion für die Erdnuss in gespiktem Zwieback

4.3.4.2. Grissini

In den Grissinis konnten Sesam und Erdnuss bis zu einer Konzentration von 0,01% detektiert werden. Im ersten Aufarbeitungsversuch konnte die Erdnuss sogar bis zu einer Konzentration von 0,005% nachgewiesen werden; dies konnte jedoch im zweiten Aufarbeitungsversuch nicht mehr erreicht werden. Beim Sesam wurde im ersten Aufarbeitungsversuch für die Spikelevels 0,005% und 0,001% im Doppelansatz jeweils ein positives Ergebnis erhalten. Im zweiten Aufarbeitungsversuch konnte Sesam bis zu einer Konzentration von 0,005% reproduzierbar detektiert werden und bei einer Konzentration von 0,001% wurde kein Signal erhalten. Beide Aufarbeitungen erfolgten mit der CTAB-Methode an unterschiedlichen Tagen. Beim Sesam waren die Ct-Werte der beiden Aufarbeitungen bis zu einer Konzentration von 0,05% sehr ähnlich, ab 0,01% jedoch sehr unterschiedlich. Bei der Erdnuss sind die Ct-Werte nur bis zu einer Konzentration von 0,1% annähernd reproduzierbar. Die Effizienz betrug für Sesam bei der ersten Aufarbeitung 101,20%, bei einem Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,985$ und für die Erdnuss 136,39% bei $R^2=0,895$. Für die zweite Aufarbeitung wurde eine Effizienz von 62,63% und $R^2=0,966$ für Sesam und eine Effizienz von 76,03% und $R^2=0,926$ für die Erdnuss erhalten. Die gemittelte Effizienz betrug 91,45%

für Sesam und 113,86% für die Erdnuss. Die Abb. 46 und 47 zeigen die zugehörigen Standardfunktionen.

Tabelle 14: Ct-Werte und Effizienz für die mit Sesam und Erdnuss gespikten Grissini

	Sesam						Erdnuss					
	1. Aufarbeitung			2. Aufarbeitung			1. Aufarbeitung			2. Aufarbeitung		
	Ct1	Ct2	Ct(MW)	Ct1	Ct2	Ct(MW)	Ct1	Ct2	Ct(MW)	Ct1	Ct2	Ct(MW)
Positivkontrolle	21,47	22,50	21,99	22,06	21,54	21,80	23,85	24,12	23,99	24,86	25,63	25,25
Spikelevel [%]												
1	27,45	26,96	27,21	27,62	27,42	27,52	29,98	29,53	29,76	30,20	29,76	29,98
0,5	28,21	27,55	27,88	28,64	28,16	28,40	30,95	30,91	30,93	31,15	30,79	30,97
0,1	30,84	31,17	31,01	30,21	30,62	30,42	33,58	34,69	34,14	32,79	33,21	33,00
0,05	32,03	32,41	32,22	31,70	32,36	32,03	34,80	33,66	34,23	38,34	35,00	36,67
0,01	33,65	35,26	34,46	37,66	36,26	36,96	34,26	34,60	34,43	37,61	37,54	37,58
0,005	34,79	-	34,79	37,32	38,70	38,01	36,86	36,70	36,78	-	-	-
0,001	-	36,80	36,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Effizienz[%]	97,08			62,63			136,39			76,03		

- Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals

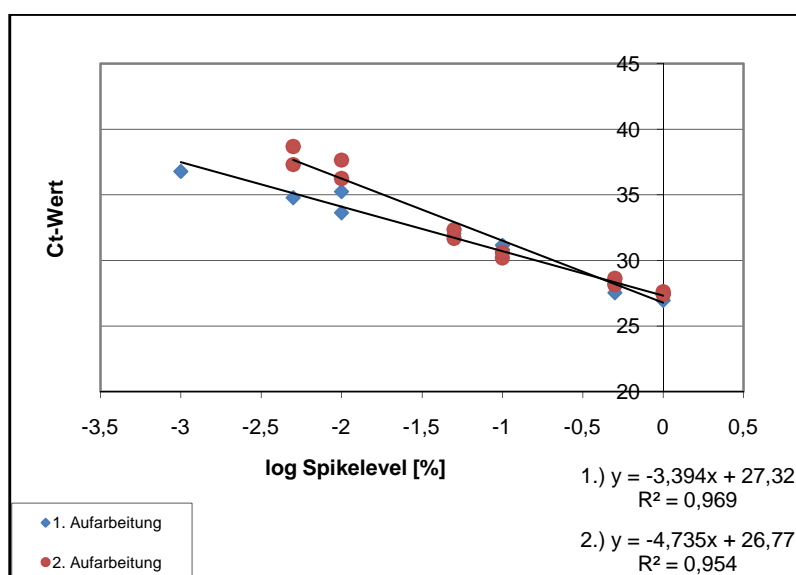


Abbildung 46: Standardfunktion für Sesam in gespikten Grissini

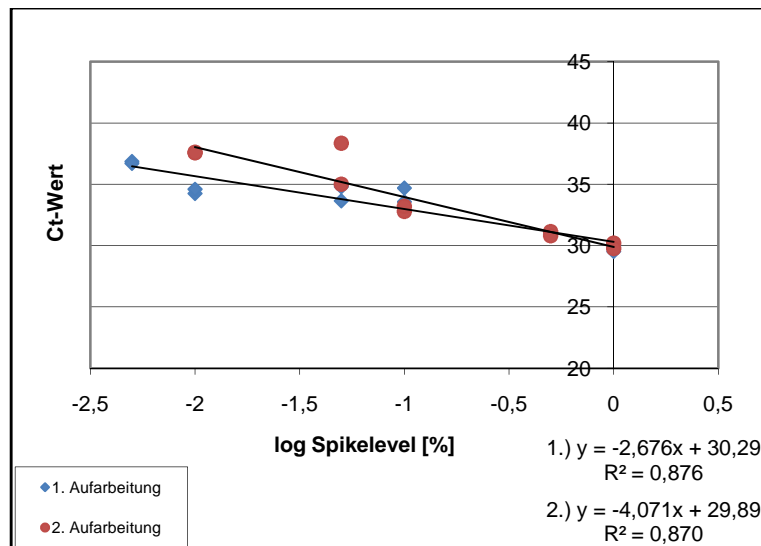


Abbildung 47: Standardfunktion für die Erdnuss in gespikten Grissini

4.3.5. Anwendung des Duplex-Assays auf kommerziell erhältliche Lebensmittel

Es wurden insgesamt 22 Lebensmittelproben auf den Inhalt von Erdnuss und Sesam untersucht. Getestet wurden 3 verschiedene Arten von Produkten, die sich durch ihre Deklaration unterschieden.

1. *Enthält Sesam und/oder Erdnuss*
2. *Kann Spuren von Sesam und/oder Erdnuss enthalten bzw. Im selben Betrieb wird Sesam und/oder Erdnuss verarbeitet*
3. *Keine Deklaration bzgl. Sesam und/oder Erdnuss*

Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Kap. 5.7. zu finden.

Die Tab. 15 zeigt eine Auflistung der getesteten Lebensmittel und die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 15: Ergebnis der Analyse von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Produkt	Deklaration		Ergebnis	
	Erdnuss	Sesam	Erdnuss	Sesam
Bio Vitalkekse	+ (13%)	+	+	+
Erdnuss-Krokant	+ (70%)	+/-	+	+
Erdnussbutter	+	-	+	-
Erdnuss-Kekse	+ (32%)	-	+	-
Erdnussflocken	+ (59%)	-	+	-
Sesam-Krokant	+/-	+	+	+
Sesam-Grissini	-	+ (14%)	-	+
Sesam-Kekse	-	+	-	+
Sesam-Brötchen	-	+	-	+
Salzcracker	+/-	+/-	-	-
Schokoladenkeks	+/-	+/-	-	-
Müsliriegel Cranberry	+/-	+/-	-	-
Müsliriegel Traube	+/-	+/-	-	-
Müsliriegel	+/-	+/-	-	-
Dinkelkekse	+/-	+/-	-	-
Kinderkekse	+/-	+/-	-	-
Haferkekse	+/-	+/-	-	-
Knäckebrot	-	+/-	-	-
Amaranthriegel	-	+/-	-	-
Früchtemüsli	-	-	-	-
Grissini	-	-	-	-
Zwieback	-	-	-	-

In sämtlichen Produkten, in denen Erdnuss bzw. Sesam enthalten sein sollte, wurde auch Erdnuss bzw. Sesam wiedergefunden.

In allen Lebensmitteln, in denen weder Erdnuss noch Sesam enthalten sein durfte, wurden diese nicht detektiert.

Im Erdnuss-Krokant, in dem Spuren von Sesam enthalten sein konnten, wurde Sesam und im Sesam-Krokant, in denen Spuren von Erdnuss enthalten sein konnten, wurde Erdnuss nachgewiesen.

In den anderen Proben, die mit „*Kann Spuren enthalten von...*“ deklariert waren, wurde weder Sesam noch Erdnuss gefunden. Einige dieser Lebensmittel wurden mehrmals analysiert, da die Ergebnisse nicht eindeutig gedeutet werden konnten (in einer Doppelbestimmung wurde ein positives und ein negatives Ergebnis erhalten). Wenn das Ergebnis auch nach mehreren Versuchen nicht eindeutig war, wurde dieses als negativ gewertet. Zu diesen Proben zählten der Amaranthriegel und der

Müsliriegel, wobei jeweils drei DNA-Extrakte in drei Duplex-Assays an verschiedenen Tagen getestet wurden. Die Tab. 16 zeigt, dass die DNA-Extrakte sowohl in einer wünschenswerten Konzentration sowie Reinheit vorlagen.

Tabelle 16: Reinheit und Konzentrationen der verwendeten DNA-Extrakte (Amaranthriegel und Müsliriegel)

Probe	Einwaage [mg]	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Konzentration [ng/µl]
Müsliriegel	100	1,9	301,25
	112	2,0	359,75
	96	2,0	309,00
Amaranthriegel	95	1,9	406,00
	100	1,8	372,50
	92	1,8	287,25

4.3.6. Inhibitionskontrolle

Mit sämtlichen Produkten, die im Duplex-Assay entweder für die Erdnuss oder für den Sesam ein negatives Signal lieferten, wurde eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Die Durchführung wird in Kap. 5.8. genauer beschrieben.

Ein positives Signal zeigte dabei, dass keine inhibierenden Bestandteile im Extrakt vorhanden waren, und die getesteten Produkte tatsächlich keinen Sesam bzw. keine Erdnuss enthielten. Ein negatives Signal würde auf die Polymerase inhibierende Inhaltsstoffe hinweisen und erhaltene Ergebnisse könnten falsch negativ gewertet worden sein.

Es wurde mit 19 Lebensmitteln eine Inhibitionskontrolle durchgeführt und es zeigten alle eindeutig positive Ergebnisse, d.h. die Extrakte enthielten keine inhibierenden Bestandteile.

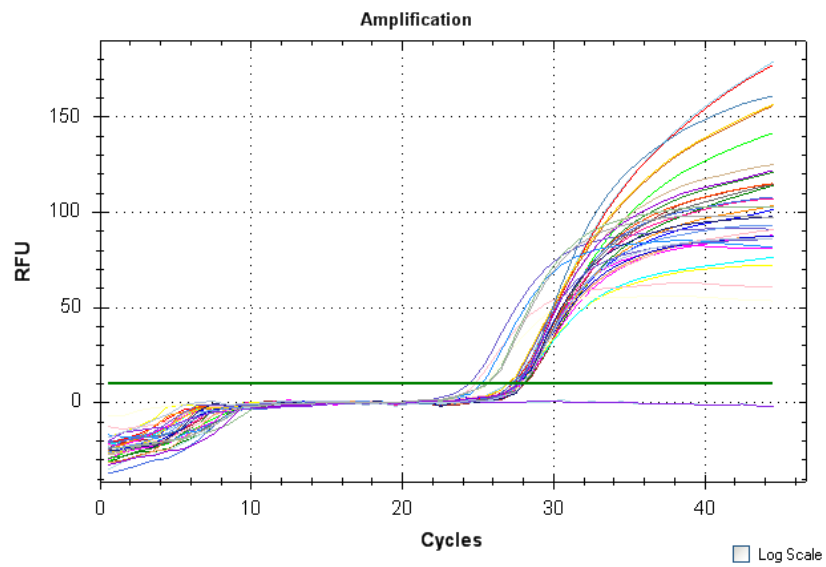


Abbildung 48: Amplifikationskurven der Inhibitionskontrolle für Erdnuss

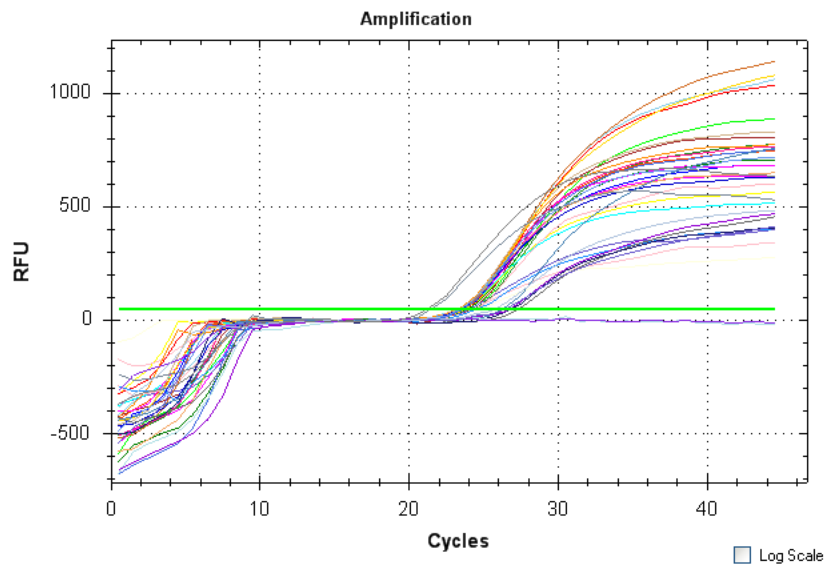


Abbildung 49: Amplifikationskurven der Inhibitionskontrolle für Sesam

5. EXPERIMENTELLES

5.1. Proben

5.1.1. Kommerziell erhältliche Lebensmittel

Sämtliche im Rahmen dieser Diplomarbeit analysierten Lebensmittel waren kommerziell erhältlich und wurden in lokalen Supermärkten gekauft. Die Proben wurden je nach ihrer Beschaffenheit mit einem Küchenmixer zerkleinert und/oder mit einem Mörser fein gemahlen. Im Anschluss wurden sie bei + 4 oder – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.1.2. Gespikte Lebensmittel

Zunächst wurden Matrices (wie Zwieback und Grissini) ausgewählt, die weder Erdnuss noch Sesam enthielten. Die Matrix, die Erdnüsse und der Sesam wurden getrennt voneinander gründlich zerkleinert bzw. gemahlen. Zum Herstellen der gespikten Lebensmittel (von 1% bis 0,001% Sesam und Erdnuss) wurden Matrix, Erdnuss und Sesam, wie folgt, eingewogen:

- 1% 98 g Matrix + 1 g Erdnuss + 1 g Sesam (Mischung 1)
- 0,5% 50 g Mischung 1 + 50 g Matrix (Mischung 2)
- 0,1% 10 g Mischung 1 + 90 g Matrix (Mischung 3)
- 0,05% 50 g Mischung 3 + 50 g Matrix (Mischung 4)
- 0,01% 10 g Mischung 3 + 90 g Matrix (Mischung 5)
- 0,005% 50 g Mischung 5 + 50 g Matrix (Mischung 6)
- 0,001% 10 g Mischung 5 + 90 g Matrix (Mischung 7)

Anschließend wurde in einer Küchenmaschine 20 min (Mischung 1) bzw. 10 min (alle weiteren Mischungen) homogenisiert.

5.2. DNA-Isolierung

5.2.1. Reagenzien

- CTAB-Extraktionslösung
20 g/l CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
1,4 M NaCl
0,1 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
0,02 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
Die Chemikalien wurden eingewogen, in etwas H₂O_{dd} gelöst, mittels HCl wurde der pH-Wert auf 8 eingestellt und die Lösung mit H₂O_{dd} auf 1 L aufgefüllt.
- CTAB-Präzipitationslösung
5 g/l CTAB
0,04 M NaCl
Die Chemikalien wurden eingewogen, in etwas H₂O_{dd} gelöst und die Lösung wurde mit H₂O_{dd} auf 1 L aufgefüllt.
- Proteinase K-Lösung
100 mg Proteinase K in
4 ml 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8)
Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- RNase-Lösung
RNase-Stocklösung (29 mg/ml, von Sigma) mit
50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8) auf c = 20 µg/ml verdünnt
Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
- QIAamp® DNA Mini Kit
- QIAamp® Stool DNA Mini Kit

5.2.2. DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode

Zuerst wurden ca. 100 mg der feingemahlten Probe in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 500 µl CTAB-Extraktionslösung versetzt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung gut gevortext und für 30 min im Trockenschrank bei 65 °C inkubiert, wobei nach jeweils 10 min erneut gut gemischt wurde. Danach wurden 15 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, gründlich gevortext und im Trockenschrank bei 65°C für 1 bis 2 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase-Lösung hinzupipettiert, kräftig gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Rückstand verworfen. Es wurden 200 µl Chloroform zugegeben und für 1 min gut gevortext. Im Anschluss wurde wieder für 5 min wie oben zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die organische wurde entsorgt. Zur wässrigen Phase wurden 2 Volumenteile CTAB-Präzipitationslösung zugefügt, gemischt und für 60 bis 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 350 µl 1,2 M NaCl-Lösung gelöst und mit 350 µl Chloroform versetzt. Dann wurde erneut für 1 min kräftig gevortext, zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die organische verworfen. Der wässrigen Phase wurden 0,6 Volumenteile Isopropanol zugegeben und es wurde wieder gut durchmischt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol versetzt, gut gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat wurde über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Am nächsten Tag wurde das Pellet in 50–100 µl H₂O_{dd} gelöst. Die so extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

5.2.3. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit

Im Kit waren enthalten: ATL Buffer, AL Buffer, AW1 Buffer, AW2 Buffer, AE Buffer, QIAamp® Mini Spin Säulen (inkl. Auffanggefäße)

Zunächst wurden ca. 25 mg der gemahlenen Probe in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 180 µl ATL Buffer versetzt. Danach wurden 20 µl Proteinase K-Lösung zugesetzt, gründlich gevortext und für 1-3 h bei 56 °C im Trockenschrank inkubiert, wobei zwischendurch öfters erneut gemischt wurde. Nach der Inkubation wurde kurz zentrifugiert und 20 µl RNase-Lösung zugefügt, kurz gevortext und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut kurz zentrifugiert, 200 µl AL Buffer zugegeben, kurz gemischt und 10 min im Trockenschrank bei 70°C inkubiert. Danach wurde kurz zentrifugiert, 200 µl Ethanol (96%) zugefügt, gut gemischt und erneut kurz zentrifugiert. Dann wurden 600 µl der Lösung vorsichtig auf eine QIAamp® Mini Spin Säule (in einem 2 ml Auffanggefäß platziert) aufgetragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß transferiert und das Filtrat verworfen. Im Anschluss wurden 500 µl AW1 Buffer vorsichtig auf die Säule aufgetragen, wie zuvor 1 min zentrifugiert, die Säule in ein neues Gefäß transferiert und das Eluat verworfen. Danach wurden 500 µl AW2 Buffer auf die Säule aufgetragen, für 1 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl AE Buffer versetzt. Es wurde 1 min inkubiert und im Anschluss 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene DNA-Extrakt wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.4. DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit

Im Kit waren enthalten: ASL Buffer, AL Buffer, AW1 Buffer, AW2 Buffer, AE Buffer, InhibitEx Tablette, QIAamp® Mini Spin Säulen (inkl. Auffanggefäße)

Es wurden 180–220 mg der zuvor gemahlten Probe in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1,6 ml ASL Buffer versetzt. Dann wurde für ca. 1 min bis zur vollständigen Homogenisierung der Probe gevortext. Danach wurde für 3 min bei 10 000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und 1,4 ml des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, der Rückstand wurde verworfen. Im Anschluss wurde der Probelösung eine InhibitEx Tablette zugesetzt und sofort bis zum Auflösen der Tablette kräftig gemischt (ca. 1 min). Dann wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Sofort danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, das Pellet verworfen und nochmals für 5 min wie zuvor zentrifugiert. In einem neuen Eppendorfgefäß wurden währenddessen 25 µl Proteinase K-Lösung vorgelegt, nach dem Zentrifugieren wurden in dieses Gefäß 600 µl des Überstandes (das Pellet wurde verworfen) und 600 µl AL Buffer hinzupipettiert und für 15 s gevortext. Im Anschluss wurde bei 75 °C im Trockenschrank für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 600 µl Ethanol (96%) zugesetzt und kräftig gemischt. Als nächstes wurden 600 µl der Probelösung vorsichtig auf eine QIAamp Spin Säule (in einem 2 ml Auffanggefäß) aufgetragen und für 3 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß transferiert, das Filtrat wurde verworfen und ein 2. Aliquot von 600 µl der Probelösung wurde aufgetragen. Es wurde wie zuvor 3 min zentrifugiert, die Säule erneut in ein neues Auffanggefäß überführt und das Eluat verworfen. Dann wurde das dritte Aliquot der Probelösung auf die Säule aufgebracht, zentrifugiert, die Säule in ein neues Gefäß überführt und das Filtrat verworfen. Im Anschluss wurden 500 µl AW1 Buffer auf die Säule aufgebracht, für 3 min zentrifugiert, die Säule wieder transferiert und das Eluat verworfen. Danach wurden 500 µl AW2 Buffer aufgetragen und für 5 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß transferiert (das Filtrat wurde wieder verworfen), es wurden 200 µl AE Buffer zugefügt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und 3 min zentrifugiert. Der so gewonnene DNA-Extrakt wurde bei – 20 °C aufbewahrt.

5.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA

Die mit den unterschiedlichen Methoden gewonnenen DNA-Extrakte wurden für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung entweder mit H₂O_{dd} (CTAB-Methode) oder dem jeweiligen Puffer (QIAamp® (Stool) DNA Mini Kit) direkt in einer UV-Mikroküvette auf ein Gesamtvolumen von 80 µl 1:5 verdünnt. Danach wurden die Extinktionen bei 260 und 280 nm im UV-Photometer gemessen. Zur Messung des Blindwerts wurden 80 µl H₂O_{dd} bzw. Puffer verwendet. Im Anschluss wurde die Konzentration über folgende Formel ermittelt.

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * V * F$$

c...Konzentration der ursprünglichen DNA-Probelösung [µg/ml]

*OD*₂₆₀...Extinktion bei 260 nm

V...Verdünnungsfaktor

F...Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA *F* = 50)

Die Konzentration sollte mindestens 20 ng/µl betragen. Die Reinheit wurde über folgende Formel berechnet:

$$\text{Reinheit} = OD_{260} / OD_{280}$$

*OD*₂₆₀...Extinktion bei 260 nm

*OD*₂₈₀...Extinktion bei 280 nm

Für eine „saubere“ DNA-Probe (frei von RNA und Proteinen) sollte der Wert für die Reinheit zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

5.4. Real Time PCR

Alle PCR-Experimente wurden in einem iCycler Thermocycler, der mit einem IQTM5 Multicolor Real Time PCR Detection System (beide von BioRad) ausgestattet war, durchgeführt.

Ein Gesamtansatz von jeweils 25 µl wurde in 96 Well Platten pipettiert, mit einer Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Sämtliche Analysen wurden im Doppel- oder Dreifachansatz durchgeführt und pro Platte wurden zwei Positiv- (Sesam- bzw. Erdnuss-DNA) und zwei Negativkontrollen (H_2O_{dd}) mitbestimmt. Da sowohl für die Proben als auch für die Positivkontrollen eine Konzentration von 20 ng/µl erforderlich war, wurden die Extrakte vor dem PCR-Lauf mit H_2O_{dd} entsprechend verdünnt. Für alle Reaktionsansätze wurde bidestilliertes und autoklaviertes Wasser verwendet.

SYBR Green®-Assay

Der SYBR Green®-Assay wurde für die Optimierung der Erdnuss-Primerkonzentrationen und der Annealingtemperatur, sowie für das Testen der Erdnuss-Primerpaare auf Kreuzreaktivität verwendet. Zur Durchführung wurden 12,5 µl IQTM SYBR Green® Supermix, 7,5 µl Mastermix (beinhaltet die Primer in den entsprechenden Konzentrationen und H_2O_{dd}) und 5 µl Probe bzw. H_2O_{dd} (für die Negativkontrolle) verwendet. Es wurde ein Temperaturprogramm, welches aus den Schritten Denaturierung, Annealing, Elongation (Detektion der Signalzunahme) und Schmelzpunktanalyse (Detektion der Signalabnahme) bestand, durchgeführt. Zur Auswertung wurden sowohl die Ct-Werte als auch die T_m-Werte herangezogen, welche mit der Positivkontrolle verglichen wurden.

TaqMan®-Assay

TaqMan®-Assays wurden nach Optimierung und Testen der Erdnuss-Primer zur weiteren Entwicklung und Optimierung des Duplex-Assays verwendet. Hierbei wurden 12,5 µl IQTM Supermix, 7,5 µl Mastermix (bestehend aus Primern und Sonden in den entsprechenden Konzentrationen und H_2O_{dd}) und 5 µl Probe bzw. H_2O_{dd} (für die Negativkontrolle) zusammenpipettiert. Zur Durchführung wurde ein Temperaturprogramm, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, verwendet. Die Detektion erfolgte während der Elongation und

zur Auswertung wurden die Ct-Werte herangezogen, welche mit einer Positivkontrolle verglichen wurden.

5.4.1. Pipettierschema

Die Wells der PCR-Platten wurden mit folgendem 25 µl – Ansatz befüllt:

12,5 µl	IQ™ SYBR Green® Supermix bzw. IQ™ Supermix
7,5 µl	Mastermix (beinhaltet Primer und Sonde)
5 µl	Probe bzw. H ₂ O _{dd} (für die Negativkontrolle)

In der folgenden Tabelle sind die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien zusammengestellt:

Tabelle 17: Ausgangskonzentrationen der Reagenzien für die Real Time PCR

	Konzentration
Supermix	2x
Erdnuss-Primer	10 µM
Erdnuss-Sonde	1 µM
Sesam-Primer	1 µM
Sesam-Sonde	10 µM
DNA-Extrakt	20 ng/µl

5.4.2. Supermix

- IQ™ SYBR Green® Supermix

Der IQ™ SYBR Green® Supermix 2x der Firma BioRad wurde für SYBR Green®-Assays verwendet und besteht aus: 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 1.6 mM dNTPs (jeweils 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); TaqDNA-Polymerase (50 units/ml); 6 mM MgCl₂, SYBR Green® I; 20 nM Fluorescein und Stabilisatoren. Der IQ™ SYBR Green® Supermix wurde aliquotiert und bei – 20°C gelagert.

- IQ™ Supermix

Der IQ™ Supermix 2x der Firma BioRad wurde für TaqMan®-Assays verwendet und beinhaltet: 100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 1.6 mM dNTPs (jeweils 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); TaqDNA-Polymerase

(50 units/ml), 6 mM MgCl₂ und Stabilisatoren. Der IQTM Supermix wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

5.4.3. Mastermix

Der sogenannte Mastermix wurde für jeden PCR-Versuch frisch und ein Gesamtansatz für die entsprechende Anzahl an Wells hergestellt. Dafür wurden der Primer forward, der Primer reverse und, im Falle des TaqMan®-Assays, die TaqMan®-Sonde in den entsprechenden Konzentrationen zusammengemischt und mit einer entsprechenden Menge H₂O_{dd} auf ein Gesamtvolumen von 7,5 µl pro Well ergänzt.

5.4.4. Primer und Sonden

Für das Design bzw. die Auswahl der Primer und der Sonden wurden zunächst Allergene mit bereits bekannten Sequenzen ausgewählt und mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Homologien zu anderen Sequenzen von anderen pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln ausgeschlossen. Im Anschluss wurden die Primer und die TaqMan®-Sonde komplementär zu einer bestimmten Sequenz des ausgewählten Allergens mit der Software Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International) unter Beachtung der Auswahlkriterien entworfen.

Zum Entwerfen dreier unterschiedlicher Erdnuss-Primerpaare und Sonden wurden die Gene, die für die Erdnuss-Allergene Agglutinin, Oleosin und Ara h 6 codieren, verwendet.

Auswahlkriterien:

Die Primer sollten 18-30 Basen lang sein und der GC-Gehalt 40-60% betragen. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst nicht mehr als 4 gleiche Basen nacheinander folgen, da dies zu unspezifischen Bindungen führen könnte, des Weiteren sollten keine palindromischen Sequenzabschnitte involviert sein. Um eine Primer-Dimer-Bildung zu vermeiden, sollte keine 3'-Komplementarität auftreten. Die Schmelz-

temperatur sollte 55 bis 80°C betragen. Eine Amplikon-Länge von 75-150 bp sollte erhalten werden.

Die TaqMan®-Sonde sollte eine Länge von 20-30 Basen und einen GC-Gehalt von 40-60% aufweisen. Es sollten nicht mehr als 3 gleiche Basen aufeinander folgen, vor allem keine Gs. Ein Strang mit mehr Cs als Gs in der Sondensequenz wäre zu bevorzugen. Am 5'-Ende der Sonde durfte sich kein G befinden und am 3'-Ende sollten nicht mehr als 3 Cs oder Gs in den letzten 5 Basen vorhanden sein. Die Sonden wurden am 5'-Ende mit dem Fluorophor (FAM bzw. Cy5) und am 3'-Ende mit dem Quencher (BHQ1 bzw. BHQ2) gelabelt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Komplementarität zu den Primern und keine Sekundärstruktur im Zielbereich bei Primern oder Sonde auftritt. Die Schmelztemperatur sollte 5-10°C höher sein als die der Primer.

5.5. Entwicklung des Duplex-Assays zur Bestimmung von Sesam und Erdnuss

5.5.1. Optimierung der Erdnuss-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

Um eine optimale Amplifikation zu gewährleisten, wurde ein SYBR Green®-Assay zur Optimierung von Primerkonzentration und Annealingtemperatur bei allen drei Primerpaaren durchgeführt. Dazu wurden jeweils Konzentrationen von 100 bis 300 nM und verschiedene Kombinationen von Konzentrationen des forward und des reverse Primers getestet. Die verschiedenen Ansätze des Mastermixes wurden, wie folgt, hergestellt:

Tabelle 18: Pipettierschema für die Optimierung der Primerkonzentrationen

Primer (f/r) [nM]	100/100	100/200	100/300	200/100	200/200	200/300	300/100	300/200	300/300
Supermix [µl]	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
Primer forward [µl]	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,5	0,75	0,75	0,75
Primer reverse [µl]	0,25	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75
H ₂ O _{dd} [µl]	7,00	6,75	6,50	6,75	6,50	6,25	6,50	6,25	6,00
DNA [µl]	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Gesamtvolumen[µl]	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00

Es wurde ein Erdnuss-DNA-Extrakt mit einer Konzentration von 20 ng/µl verwendet.

Zur Optimierung der Annealingtemperatur wurde ein Temperaturgradient von 52,8-62,0 °C angelegt.

Nach Einbringen der PCR-Platte in den Thermocycler wurde folgendes Temperaturprogramm inklusive Schmelzpunktanalyse gewählt:

Tabelle 19: Temperaturprogramm für die Primeroptimierung

Zyklen	Dauer	Temperatur
1x	3 min	95 °C
45x	20 sec	95 °C
	40 sec	52,8-62,0 °C
	10 sec	72 °C
81x	10 sec	55-95 °C

5.5.2. Bestimmung der Kreuzreaktivität der Primer

Es wurden 28 verschiedene Lebensmittel auf Kreuzreaktivität mit den drei ausgewählten Primerpaaren der Erdnuss getestet. Getestet wurden sowohl mit der Erdnuss biologisch verwandte als auch in Erdnussprodukten vorkommende Lebensmittel bzw. -zutaten, wie Haselnuss, Mandel, Paranuss, Pekanuss, Walnuss, Cashewkerne, Macadamia, Kürbiskerne, Sonnenblumenkerne, Pinienkerne, Pistazie, Sesam, schwarzer Sesam, Leinsamen, Mohn, Soja, Reis, Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Dinkel, Hafer, Lupine, Kichererbsen, Linsen, weiße Bohnen und Erbsen.

Die DNA der jeweiligen Proben wurde wie unter Kapitel 5.2. beschrieben extrahiert, die Reinheit und die Konzentration der DNA-Extrakte wurden bestimmt (vgl. Kap. 5.3.) und sämtliche DNA-Extrakte wurden mit H₂O_{dd} auf eine Konzentration von 20 ng/μl gebracht.

Real Time PCR

Als Supermix wurde der IQTM SYBR Green® Supermix verwendet und für die drei unterschiedlichen Primerpaare wurde je ein Mastermix mit den optimierten Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Pipettierschema der Kreuzreaktivitätstests für die einzelnen Primerpaare

	Primerpaar 1	Primerpaar 2	Primerpaar 3
Primer (f/r) [nM]	300/200	300/300	300/200
Supermix [μl]	12,50	12,50	12,50
Primer forward [μl]	0,75	0,75	0,75
Primer reverse [μl]	0,50	0,75	0,50
H ₂ O _{dd} [μl]	6,25	6,00	6,25
DNA-Extrakt [μl]	5,00	5,00	5,00
Gesamtvolumen [μl]	25,00	25,00	25,00

Als Positivkontrolle diente ein Erdnuss DNA-Extrakt mit einer Konzentration von 20 ng/μl. Die PCR wurde für jedes Primerpaar mit der jeweils benötigten Annealingtemperatur durchgeführt.

Tabelle 21: Temperaturprogramm für die Kreuzreaktivitätstests

Zyklen	Dauer	Temperatur
1x	3 min	95°C
50x	20 sec	95°C
	40 sec	x
	10 sec	72°C
81x	10 sec	55-95°C

x...für Primerpaar 1 und 2 56 °C, für Primerpaar 3 53 °C

Im Anschluss an die Real Time PCR wurden die DNA-Amplifikate auf ein Gel aufgetragen und mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

Die DNA-Banden wurden am UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert.

Agarosegelelektrophorese

Herstellung des Agarosegels

Reagenzien:

- Ethidiumbromid-Lösung (c=10 mg/ml)
- 50x TAE-Buffer (Tris-Acetate-EDTA)

242 g Tris-Base

57,1 ml Essigsäure, konz.

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8

Die Reagenzien wurden eingewogen und in etwas H₂O_{dd} gelöst.

Die Lösung wurde mit H₂O_{dd} auf 1 L aufgefüllt und 1:50 verdünnt.

Zur Herstellung eines 3%igen Gels wurden 4,5 g Agarose mit 150 ml 1x TAE-Puffer versetzt und im Mikrowellenherd bis zum vollständigen Auflösen erhitzt. Im Anschluss wurden 2,25 µl Ethidiumbromid-Lösung zugefügt, gut durchmischt und in die Gelgießapparatur gegossen und der Kamm hineingesteckt. Danach wurde die Mischung 1 bis 2 h zum Festwerden stehen gelassen.

Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresewanne überführt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm wurde entfernt. Die 5x Stocklösung des Nucleic Acid Sample Loading Buffer (BioRad) wurde 1:5 mit H₂O_{dd} verdünnt. Auf das Gel wurde eine Mischung aus jeweils 10 µl PCR-Amplifikat und 10 µl 1x Nucleic Acid Sample Loading Buffer aufgetragen. Um eine Größenzuordnung treffen zu können, wurde zusätzlich ein 20 bp Längenmarker aufgetragen (5-10 µl). Im Anschluss wurde die Agarosegelelektrophorese bei 150 V für ca. 1 h laufen gelassen. Danach konnten die Banden durch das Ethidiumbromid am UV-Transilluminator betrachtet und ein Foto gemacht werden.

5.5.3. Optimierung der Erdnuss-Sondenkonzentration

Zur Optimierung des TaqMan®-Assays wurden Erdnuss-Sondenkonzentrationen von 10, 25, 35, 50, 75, 100 und 200 nM getestet. Hierbei wurde der IQTM Supermix verwendet und für jede Sondenkonzentration wurde ein eigener Mastermix hergestellt. Als Probe diente ein Erdnuss-DNA-Extrakt mit einer Konzentration von 20 ng/μl. Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

Tabelle 22: Pipettierschema der TaqMan®-Sondenoptimierung für Primerpaar 2

Sondenkonz. [nM]	10	25	35	50	75	100	200
Supermix (IQ TM) [μl]	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
Primer forward [μl]	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Primer reverse [μl]	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Sonde [μl]	0,25	0,625	0,875	1,25	1,875	0,25	0,50
H ₂ O _{dd} [μl]	5,75	5,375	5,125	4,75	4,125	5,75	5,50
DNA-Extrakt [μl]	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Gesamtvolumen [μl]	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00

Im Anschluss wurde die Real Time PCR mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 23: Temperaturprogramm für die TaqMan®-Sondenoptimierung

Zyklen	Dauer	Temperatur
1x	3 min	95°C
45x	20 sec	95°C
	40 sec	56°C
	10 sec	72°C

5.5.4. Bestimmung der Kreuzreaktivität des TaqMan®-Assays

Nach Optimierung der Primer-/Sondenkonzentration und der Annealingtemperatur wurden die Kreuzreaktivitätstests für Proben, bei denen eine Kreuzreaktivität zuvor nicht zur Gänze ausgeschlossen werden konnte, nochmals mit dem TaqMan®-Assay durchgeführt. Es wurden die gleichen DNA-Extrakte verwendet, die bereits in dem unter Kap. 5.5.2. beschriebenen Versuch benützt worden waren. Für den

TaqMan®-Assay wurde der IQ™ Supermix und folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 24: Pipettierschema für die Kreuzreaktivitätstests mit dem TaqMan®-Assay

Supermix (IQ™) [µl]	12,50
Primer forward [µl]	0,75
Primer reverse [µl]	0,75
Sonde [µl]	1,875
H ₂ O _{dd} [µl]	4,125
DNA-Extrakt [µl]	5,00
Gesamtvolumen [µl]	25,00

Als Positivkontrolle diente ein Erdnuss-DNA-Extrakt mit c=20 ng/µl. Die PCR wurde im Anschluss mit dem in Tab. 23 angegebenen Temperaturprogramm durchgeführt.

5.5.5. Erstellen einer Standardfunktion und Ermittlung der Effizienz des TaqMan®-Assays

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des optimierten TaqMan®-Assays wurde eine Standardfunktion erstellt. Dafür wurde zunächst Erdnuss-DNA mit der CTAB-Methode extrahiert (siehe Kap. 5.2.2.), die Konzentration und die Reinheit der Extrakte bestimmt (siehe Kap. 5.3.) und eine Erdnuss-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 20 ng/µl hergestellt. Ausgehend von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die Lösung von 1:10 bis 1:100 000 mit H₂O_{dd} verdünnt wurde. Danach wurde ein TaqMan®-Assay durchgeführt. Es wurde das in Kap. 5.5.4. angegeben Pipettierschema und das in Kap. 5.5.3 angegebene Temperaturprogramm herangezogen.

5.5.6. Bedingungen des Duplex-Assays

Der Erdnuss- und der Sesam-Singleplex-Assays wurden zu einem Duplex-Assay vereinigt. Die folgenden Tabellen zeigen das in den weiteren Versuchen verwendete Pipettierschema und das Temperaturprogramm.

Tabelle 25 a und b: Pipettierschema und Temperaturprogramm des Duplex-Assays

a)

Supermix (IQ™) [μl]	12,5
Erdnuss-Primer forward [μl]	0,75
Erdnuss-Primer reverse [μl]	0,75
Erdnuss-Sonde [μl]	1,875
Sesam-Primer forward [μl]	1,25
Sesam-Primer reverse [μl]	1,25
Sesam-Sonde [μl]	0,5
H ₂ O _{dd} [μl]	1,125
DNA [μl]	5,0
Gesamtvolumen [μl]	25,0

b)

Zyklen	Dauer	Temperatur
1x	3 min	95°C
45x	20 sec	95°C
	40 sec	56°C
	13 sec	72°C

5.5.7. Erstellen einer Standardfunktion und Ermittlung der Effizienz des Duplex-Assays

Um die Nachweisgrenze des Duplex-TaqMan®-Assays zu bestimmen, wurden zwei Standardfunktionen mit unterschiedlicher DNA (Sesam- bzw. Erdnuss-DNA), aber gleichem Mastermix (enthält sowohl Erdnuss- als auch Sesam-Primerpaar/Sonde) erstellt. Dazu wurden Sesam-DNA und Erdnuss-DNA mit der CTAB-Methode extrahiert (siehe Kap. 5.2.2.), Reinheit und Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kap. 5.3.) und jeweils eine Sesam-DNA- und eine Erdnuss-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 20 ng/μl hergestellt. Ausgehend von diesen wurden zwei separate Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:10 000 mit H₂O_{dd} hergestellt. Im Anschluss wurde eine PCR mit dem in Tab. 25 b angegebenen Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt:

5.5.8. Testen des Duplex-Assays mit Erdnuss-/ Sesam-DNA-Mischungen

Um festzustellen, ob Sesam- und Erdnuss-DNA in Anwesenheit der jeweils anderen DNA detektiert werden kann, wurden verschiedene Erdnuss-/ Sesam-DNA-Mischungen hergestellt (jeweils 100 µl). Hierbei wurde die DNA jeweils, wie zuvor beschrieben, extrahiert (vgl. Kap. 5.2.2.), die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch gemessen (vgl. Kap. 5.3.) und Lösungen mit $c=20$ ng/µl hergestellt. Ausgehend von diesen Lösungen wurden Mischungen wie folgt hergestellt:

1. 1% (v/v) Sesam-DNA + 99% (v/v) Erdnuss-DNA
2. 99% (v/v) Sesam-DNA + 1% (v/v) Erdnuss-DNA
3. 50% (v/v) Sesam-DNA + 50% (v/v) Erdnuss-DNA

Mit diesen Mischungen wurde ein Duplex-Assay mit dem gleichen Pipettierschema und Temperaturprogramm, wie unter Kap. 5.5.6. beschrieben, durchgeführt.

5.5.9. Optimierung des Duplex-Assays

- Erhöhung der Sesam- Primerkonzentration

Es wurde ein TaqMan®-Assay mit verschiedenen Mastermixes durchgeführt, wobei jeweils nur die Konzentrationen des Sesam-Primerpaares verändert wurden. Zum Testen der Mastermixe wurden die DNA-Mischungen 1 und 2, wie in Kap. 5.5.8. beschrieben, hergestellt. Zur Durchführung der PCR wurde das Temperaturprogramm aus Kap. 5.5.6. und folgendes Pipettierschema angewandt:

Tabelle 26: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Sesam-Primerkonzentrationen

Sesam-Primerkonzentration (f/r) [nM]	50/50	100/100	200/200
Supermix (IQ™) [μl]	12,5	12,5	12,5
Erdnuss-Primer forward [μl]	0,75	0,75	0,75
Erdnuss-Primer reverse [μl]	0,75	0,75	0,75
Erdnuss-Sonde [μl]	1,875	1,875	1,875
Sesam-Primer forward [μl]	1,25	0,25	0,5
Sesam-Primer reverse [μl]	1,25	0,25	0,5
Sesam-Sonde [μl]	0,5	0,5	0,5
H ₂ O _{dd} [μl]	1,125	3,125	2,625
DNA-Extrakt [μl]	5,0	5,0	5,0
Gesamtvolumen [μl]	25,0	25,0	25,0

Zur Herstellung des Mastermixes mit einer Primerkonzentration von 50 nM wurde eine 1 μM Primer-Lösung und für die Mastermixe mit einer Primerkonzentration von 100 und 200 nM wurde eine 10 μM Primer-Lösung verwendet.

- Erniedrigung der Erdnuss-Primerkonzentration

Es wurden verschiedene Mastermixe hergestellt, bei denen nur die Erdnuss-Primerkonzentrationen verändert wurden. Im Anschluss wurde eine PCR mit den DNA-Mischungen 1 und 2 (Herstellung siehe Kap. 5.5.8.) und dem folgendem Pipettierschema durchgeführt.

Tabelle 27: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Erdnuss-Primerkonzentrationen

Erdnuss-Primerkonzentration (f/r) [nM]	300/300	200/200	100/100	50/50
Supermix (IQ™) [μl]	12,5	12,5	12,5	12,5
Erdnuss-Primer forward [μl]	0,75	0,5	0,25	0,125
Erdnuss-Primer reverse [μl]	0,75	0,5	0,25	0,125
Erdnuss-Sonde [μl]	1,875	1,875	1,875	1,875
Sesam-Primer forward [μl]	1,25	1,25	1,25	1,25
Sesam-Primer reverse [μl]	1,25	1,25	1,25	1,25
Sesam-Sonde [μl]	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O _{dd} [μl]	1,125	1,625	2,125	2,375
DNA-Extrakt [μl]	5,0	5,0	5,0	5,0
Gesamtvolumen [μl]	25,0	25,0	25,0	25,0

Es wurde das in Kap. 5.5.6. beschriebene Temperaturprogramm verwendet.

- Veränderung der Konzentration der Sesam-Sonde

Es wurden verschiedene Mastermixe mit unterschiedlichen Sonden-Konzentrationen hergestellt und folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 28: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Sesam-Sondenkonzentration

Sondenkonzentration [nM]	25	50	100	200
Supermix (IQ™) [µl]	12,5	12,5	12,5	12,5
Erdnuss-Primer forward [µl]	0,75	0,75	0,75	0,75
Erdnuss-Primer reverse [µl]	0,75	0,75	0,75	0,75
Erdnuss-Sonde [µl]	1,875	1,875	1,875	1,875
Sesam-Primer forward [µl]	1,25	1,25	1,25	1,25
Sesam-Primer reverse [µl]	1,25	1,25	1,25	1,25
Sesam-Sonde [µl]	0,625	1,25	0,25	0,5
H ₂ O _{dd} [µl]	1,0	0,375	1,375	1,125
DNA-Extrakt [µl]	5,0	5,0	5,0	5,0
Gesamtvolumen [µl]	25,0	25,0	25,0	25,0

Zur Herstellung der Mastermixe mit einer Sondenkonzentration von 25 und 50 nM wurde eine 1 µM Sesam-Sonden-Lösung und für 100 und 200 nM eine 10 µM Sesam-Sonden-Lösung verwendet.

Die Herstellung der DNA-Mischungen ist in Kap. 5.5.8., das Temperaturprogramm in Kap. 5.5.6. beschrieben.

- Veränderung der Konzentration der Erdnuss-Sonde

Es wurden zwei verschiedene Mastermixe mit unterschiedlichen Konzentrationen an Erdnuss-Sonde hergestellt und das in Kap. 5.5.6. beschriebene Temperaturprogramm verwendet. Es wurden die in Kap. 5.5.8. angegebenen DNA-Mischungen verwendet.

Tabelle 29: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Erdnuss-Sondenkonzentration

Erdnuss-Sondenkonzentration [nM]	25	50
Supermix (IQ™) [μl]	12,5	12,5
Erdnuss-Primer forward [μl]	0,75	0,75
Erdnuss-Primer reverse [μl]	0,75	0,75
Erdnuss-Sonde [μl]	0,625	1,875
Sesam-Primer forward [μl]	1,25	1,25
Sesam-Primer reverse [μl]	1,25	1,25
Sesam-Sonde [μl]	0,5	0,5
H ₂ O _{dd} [μl]	2,375	1,125
DNA-Extrakt [μl]	5	5
Gesamtvolumen [μl]	25	25

5.6. Bestimmung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays

Es wurden Matrices (Zwieback und Grissini) ausgewählt, die im Duplex-Assay zuvor ein eindeutig negatives Signal geliefert hatten. Die Matrices wurden mit Erdnuss und Sesam gespikt (siehe Kap. 5.1.2.).

Die gespikten Proben wurden mit der CTAB-Methode extrahiert (vgl. Kap. 5.2.2.) und DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt (vgl. Kap. 5.3.). Die Proben wurden im Anschluss auf eine Konzentration von 20 ng/μl mit H₂O_{dd} verdünnt. Danach wurde ein Duplex-Assay mit dem in Kap. 5.5.6. angegebenen Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt

5.7. Nachweis von Erdnuss und Sesam in kommerziell erhältlichen Proben

Die kommerziellen Lebensmittelproben wurden mit der CTAB-Methode, dem QIAamp®DNA Mini Kit oder dem QIAamp®DNA Stool Mini Kit (siehe Kap. 5.2.) aufgearbeitet, die DNA-Konzentration und die Reinheit wurde photometrisch bestimmt (siehe Kap. 5.3.) und eine Konzentration von 20 ng/μl wurde durch Verdünnen mit H₂O_{dd} eingestellt. Die so präparierten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Im Anschluss wurde mit den Proben ein Duplex-Assay mit dem IQ™ Supermix durchgeführt. Es wurde ein Mastermix hergestellt und das Pipettierschema und Temperaturprogramm aus Kap. 5.5.6. herangezogen.

5.8. Inhibitionskontrolle

Sämtliche Lebensmittel, die im Duplex-Assay ein negatives Signal lieferten, wurden auf inhibierende Bestandteile, welche ein falsch negatives Ergebnisse liefern würden, untersucht.

Dazu wurde in die PCR-Wells je 1 µl Sesam- bzw. Erdnuss-DNA-Extrakt mit $c=20$ ng/µl vorgelegt und über Nacht im Kühlschrank (+4°C) getrocknet. Am nächsten Tag wurde ein Duplex-Assay mit den Lebensmittel-DNA-Extrakten auf der präparierten Platte durchgeführt (vgl. Kap. 5.6.).

5.9. Verwendete Chemikalien

- Certified TM PCR Agarose, BioRad
- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Sigma-Aldrich
- Chloroform 99%, Roth
- DNA-Exitus PlusTM, AppliChem GMBH
- EDTA, Titriplex III, Merck
- Ethidiumbromid Lösung 10 mg/ml, BioRad
- Ethanol, Roth
- Isopropanol 99,5%, Sigma-Aldrich
- iQTM Supermix 2x, BioRad
- iQTM SYBR® Green Supermix 2x, BioRad
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, Merck
- Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5x, BioRad
- Primer, Sigma-Aldrich
- Proteinase K from Tritirachium album, Sigma-Aldrich
- QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen
- QIAamp® DNA Stool Mini Kit, Qiagen
- RNase, Sigma-Aldrich
- TaqMan® Sonden, Metabion
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) Trizma® base, Sigma-Aldrich
- 20 bp Loading-Buffer, BioRad

5.10. Verwendete Geräte

5.10.1. Allgemein

- Kolbenhubpipetten: 0,5-10 µl, BioRad
2-20 µl, BioRad
20-200 µl, BioRad
100-1000 µl, BioRad
- Küchenmixer: GV A2, Krups
- Universal-Küchenmaschine: HR 7621, Philips
- Analysenwaage: AT 400, Mettler
- Vortexer: Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
VV3 S40, VWR
- Zentrifugen: Centrifuge 5424, Eppendorf
4 K 10 mit Rotor 11140, Sigma
- Trockenschrank: Model 500, Memmert
- Photometer: Genesys 10UV, Thermo Scientific
- pH-Meter: Metrohm 691

5.10.2. PCR und Agarosegelelektrophorese

- Thermocycler: iCycler, BioRad
- Detektor: iQTM 5 Multicolor Real Time PCR Detection
System, BioRad
- Mikrowellenofen: Modell MW 1700, Silva Austria
- Elektrophoreseapparatur: Power PactTM HV Power Supply, BioRad
- UV-Lampe: Transilluminator 312 nm: Herolab UVT-
20
- Photocamera: Power Shot A 630, Canon

6. ZUSAMMENFASSUNG

Allergische Reaktionen werden heutzutage vor allem in Industrieländern zu einem immer größer werdenden Gesundheitsproblem. Sesam und Erdnuss gehören zu den 14 Lebensmittelzutaten, die laut EU-Richtlinien deklarationspflichtig sind. Um die Einhaltung der gesetzlichen Regelungen überprüfen zu können, benötigt man Analysemethoden, die die Detektion der deklarationspflichtigen allergenen Zutaten ermöglichen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits eine Real Time PCR-Methode zur Detektion von Sesam und eine Duplex-Real Time PCR-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Haselnuss in Lebensmitteln entwickelt und validiert.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine Duplex-Real Time PCR-Methode zur gleichzeitigen Detektion von Sesam und Erdnuss in Lebensmitteln zu entwickeln. Zunächst wurde ein Singleplex-Assay für die Amplifizierung und Detektion der Erdnuss unter Anpassung an die Bedingungen der bereits entwickelten Methode für Sesam erarbeitet.

Für Sesam wurde das Gen, welches für das Hauptallergen Ses i 1 codiert, und für die Erdnuss die Gene, die für die allergenen Proteine Agglutinin, Oleosin und Ara h 6 codieren, herangezogen. Für Letztere wurden Primer und Sonden entworfen und die Primerkonzentrationen sowie Annealingtemperaturen optimiert. Im Anschluss wurden mit den 3 Primerpaaren Kreuzreaktivitätstests mit 28 gängigen Zutaten (Nüsse, Leguminosen, Getreidearten etc.) von Erdnuss- und auch Sesamprodukten durchgeführt. Die für Agglutinin und Ara h 6 entworfenen Primerpaare schieden im Verlauf dieser Tests aus. Für das Primerpaar, das zu einer Sequenz des Oleosin-Gens komplementär war, wurde die zugehörige TaqMan®-Sonde entworfen und ebenfalls die Konzentration optimiert. Die TaqMan®-Sonde der Erdnuss wurde mit dem Fluorophor Cy5 und dem Quencher BHQ2 und die TaqMan®-Sonde des Sesams mit FAM bzw. BHQ2 markiert.

Die Amplifikationseffizienz des Erdnuss-Singleplex-Assays wurde durch eine Verdünnungsreihe eines reinen Erdnuss-DNA-Extraktes von 1:1 bis 1:100 000 ermittelt, sie betrug 91,8%.

Im Anschluss wurde die Duplex-Methode entwickelt und auch hier die Amplifikationseffizienz durch die jeweiligen Verdünnungsreihen eines reinen Erdnuss- bzw. Sesam-DNA-Extraktes bestimmt. Diese betrug für die Erdnuss 99,7% und für Sesam 94,0%. In beiden Fällen konnte die DNA bis zu einer Verdünnung von 1:10 000 detektiert werden, dies entspricht einer absoluten Menge von 10 pg. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des Duplex-Assays für Sesam und Erdnuss wurden zwei Matrices (Zwieback, Grissini) mit Erdnuss und Sesam in verschiedenen Konzentrationen gespikt und mit diesen eine Standardfunktion ermittelt. In Zwieback wurde eine Amplifikationseffizienz von 94,6% für Erdnuss und 83,2% für Sesam ermittelt. Beide konnten bis zu einer Konzentration von 50 mg/kg nachgewiesen werden. Im Falle der Grissini konnte eine Amplifikationseffizienz von 113,9% für Erdnuss und 91,45% für Sesam bestimmt werden. Bei den Grissinis konnten Erdnuss und Sesam bis zu einer Konzentration von 100 mg/kg reproduzierbar detektiert werden.

Des Weiteren wurden 22 verschiedene, kommerziell erhältliche Lebensmittel, wie Cracker, Kekse, Müsliriegel etc. auf Spuren von Sesam und/oder Erdnuss zur Überprüfung der Methode untersucht.

7. ABSTRACT

The increasing prevalence of food allergies has become a serious health problem. For a sensitized person the complete avoidance of the allergenic food is the only way to prevent an allergic response. Sesame (*Sesamum indicum*) and peanut (*Arachis hypogaea*) belong to the 14 allergenic foods which have to be declared on the food ingredient list according to EU regulations. Among all foods known to be allergenic, sesame and peanut particularly have been reported to cause life-threatening anaphylactic reactions.

The diploma thesis deals with the development and validation of a duplex real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method allowing the simultaneous detection of traces of sesame and peanut in food. For the detection of sesame and peanut, the genes coding for the major allergenic sesame protein Ses i 1 and the protein oleosine were selected, respectively. The Ses i 1 TaqMan® probe was labelled with the reporter dye FAM (6-carboxyfluorescein) on the 5' end and the Black hole quencher BHQ 1 on the 3' end. The oleosin TaqMan® probe was labelled with Cy5 (Cyanine 5) and quenched with the Black hole quencher BHQ 2.

The duplex real-time PCR assay did not show any cross-reactivity with 28 common food ingredients from sesame and/or peanut containing foods, such as legumes, nuts, cereals and seeds, (wheat, rye, spelt, barley, oat, rice, corn, poppy seed, linseed, soya, lupine, white beans, peas, chickpeas, lentils, hazelnut, almond, walnut, brazil nut, cashew nut, pecans, macadamia, pumpkin seeds, sunflower seeds, pistachio, pignolia).

The amplification efficiency was calculated with dilution series of both analytes (sesame and peanut), starting from a concentration of 20 ng/µl. From the slope of the standard curves efficiencies of 99,7% (peanut) and 94,0% (sesame) were calculated.

The limit of detection was determined by spiking different matrices (crisp toast and grissini) from 0,001 to 1 % of peanut or sesame. The standard

curve and the amplification efficiency were calculated (the efficiency was 83,2% (sesame) and 94,6% (peanut). Using crisp toast the LOD was 50 ppm for both analytes. When using Grissini as matrix the efficiency for sesame and for peanut were 91,5% and: 113,9%, respectively. For both allergenic foods the LOD was 100 ppm.

The applicability of the real-time PCR assay to determine sesame and peanut in different food matrices was investigated by analyzing 22 commercial foodstuffs comprising salty snacks, cookies, creams, mueslis and muesli bars, crisp breads and brittles. In every sample with sesame and/or peanut, sesame and/or peanut was detected. In two of the samples which were declared with “can contain traces of...” sesame or peanut was detected. In the other samples which were declared with “can contain traces of...” , neither sesame nor peanut was detected. In none of the samples without any declaration sesame or peanut were detected.

8. ANHANG

8.1. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
Ct	Threshold Cycle
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Erd	Erdnuss
etc.	et cetera
G	Guanin
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
l	Liter

M	Mischung
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
neg.	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
OD ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pos.	positiv
ppm	parts per million
rpm	rounds per minute
Ses	Sesam
sog.	sogenannte(r/s)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tm	Schmelzpunkt
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung der Nahrungsmittelunverträglichkeitsreaktionen [Ortolani und Pastorello, 2006]	8
Abbildung 2: Aufbau der DNA [Alberts et al., 2004].....	30
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der PCR [Alberts et al., 2004]	36
Abbildung 4: Funktionsweise von SYBR Green® [BioRad Laboratories, 2006].....	38
Abbildung 5: Funktionsweise der TaqMan®-Sonde [BioRad Laboratories, 2006].....	39
Abbildung 6: Funktionsweise der Molecular Beacon-Sonde [BioRad Laboratories, 2006].....	40
Abbildung 7: Funktionsweise der Hybridisierungssonde [BioRad Laboratories, 2006; Müller, 2001]	41
Abbildung 8: Funktionsweise der Eclipse-Sonde [BioRad Laboratories, 2006].....	42
Abbildung 9: Funktionsweise der Amplifluor-Methode [BioRad Laboratories, 2006].....	43
Abbildung 10: Funktionsweise der Scorpions [BioRad Laboratories, 2006].....	44
Abbildung 11: Funktionsweise der LUX-Primer [BioRad Laboratories, 2006].....	45
Abbildung 12: Funktionsweise der BD QZyme Primer [BioRad Laboratories, 2006].....	46
Abbildung 13: Amplifikationskurve [BioRad Laboratories, 2006].....	47
Abbildung 14: Amplifikationskurven und Standardkurve für seriell verdünnte Erdnuss-DNA	49
Abbildung 15: Abnahme der Intensität eines Lichtstrahls beim Durchgang durch eine Küvette; modifiziert nach [Otto, 2000].....	51
Abbildung 16: Bei der Primeroptimierung erhaltene Amplifikationskurven (Primerpaar 2)	58
Abbildung 17: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 1.....	58

Abbildung 18: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 2	59
Abbildung 19: Auswertung des Optimierungsversuches für Primerpaar 3	59
Abbildung 20: Amplifikationskurven für DNA aus Erdnuss, Paranuss und Pistazie mit Primerpaar 1	61
Abbildung 21: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 1 gebildeten Produkte	61
Abbildung 22: Beispiel eines Agarosegels der mit dem Primerpaar 1 gebildeten Produkte	62
Abbildung 23: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 2 erhaltenen Produkte.....	63
Abbildung 24: 1. Ableitung der Schmelzkurven der mit dem Primerpaar 3 erhaltenen Produkte.....	63
Abbildung 25: Amplifikationskurven für die DNA aus Erdnuss, Pekanuss und Sonnenblumenkernen im TaqMan®-Assay	65
Abbildung 26: Standardkurve für seriell verdünnte Erdnuss-DNA (Log Starting Quantity in ng)	66
Abbildung 27: Amplifikationskurven des Duplex-Assays für Erdnuss	68
Abbildung 28: Amplifikationskurven des Duplex-Assays für Sesam	68
Abbildung 29: Amplifikationskurven für seriell verdünnte Erdnuss-DNA im Duplex-Assay.....	70
Abbildung 30: Amplifikationskurven für seriell verdünnte Sesam-DNA im Duplex-Assay.....	70
Abbildung 31: Standardfunktionen für seriell verdünnte Sesam- und Erdnuss-DNA im Duplex-Assay (Log Starting Quantity in ng)	71
Abbildung 32: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Sesam-Primerkonzentrationen.....	72
Abbildung 33: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Sesam-Primerkonzentrationen.....	73

Abbildung 34: Einfluss der Sesam-Primerkonzentration auf die Detektion von Erdnuss-DNA und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)	73
Abbildung 35: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Erdnuss-Primerkonzentrationen	74
Abbildung 36: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Erdnuss-Primerkonzentrationen	75
Abbildung 37: Einfluss der Erdnuss-Primerkonzentration auf die Detektion von Erdnuss- und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA).....	75
Abbildung 38: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Sesam-Sondenkonzentrationen	76
Abbildung 39: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Sesam-Sondenkonzentrationen	77
Abbildung 40: Einfluss der Sesam-Sondenkonzentration auf die Detektion von Erdnuss- und Sesam-DNA in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA).....	77
Abbildung 41: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Erdnuss bei unterschiedlichen Erdnuss-Sondenkonzentrationen	78
Abbildung 42: Amplifikationskurven der Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA) für Sesam bei unterschiedlichen Erdnuss-Sondenkonzentrationen	79
Abbildung 43: Einfluss der Erdnuss-Sondenkonzentration auf die Detektion von Erdnuss und Sesam in Mischung 1 (99% Erdnuss-, 1% Sesam-DNA) und 2 (1% Erdnuss-, 99% Sesam-DNA)	79
Abbildung 44: Standardfunktion für Sesam in gespicktem Zwieback.....	81
Abbildung 45: Standardfunktion für die Erdnuss in gespicktem Zwieback ..	82
Abbildung 46: Standardfunktion für Sesam in gespickten Grissini	83
Abbildung 47: Standardfunktion für die Erdnuss in gespickten Grissini	84

Abbildung 48: Amplifikationskurven der Inhibitionskontrolle für Erdnuss . 87

Abbildung 49: Amplifikationskurven der Inhibitionskontrolle für Sesam ... 87

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Symptome nach EFSA [European Food Safety Authority, 2004]	13
Tabelle 2: Ergebnisse der DNA-Extraktion mit der CTAB-Methode	53
Tabelle 3: Ergebnisse der DNA-Extraktion aus gespiktem Zwieback mit der CTAB-Methode	54
Tabelle 4: Ergebnisse des ersten Versuchs der DNA-Extraktion der gespikten Grissinis mit der CTAB-Methode.....	55
Tabelle 5: Verwendete DNA-Extrakte der gespikten Grissinis (3. Aufarbeitungsversuch)	55
Tabelle 6: Verwendete Primer und TaqMan®-Sonden.....	57
Tabelle 7: Optimierte Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen für Primerpaar 1-3	60
Tabelle 8: Aufstellung der getesteten Erdnuss-Sondenkonzentrationen mit den zugehörigen Ct-Werten	64
Tabelle 9: Verwendete Primer- und Sonden-Konzentrationen im Duplex-Assay	67
Tabelle 10: Temperaturprogramm des Duplex-Assays	67
Tabelle 11: Auflistung der Ct-Werte für die Mischungen 1-3 im Duplex-Assay	69
Tabelle 12: Verwendete Primer- und Sondenkonzentrationen des Duplex-Assays.....	80
Tabelle 13: Ct-Werte und Effizienz für mit Sesam und Erdnuss gespikten Zwieback	81
Tabelle 14: Ct-Werte und Effizienz für die mit Sesam und Erdnuss gespikten Grissini	83
Tabelle 15: Ergebnis der Analyse von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln	85
Tabelle 16: Reinheit und Konzentrationen der verwendeten DNA-Extrakte (Amaranthriegel und Müsliriegel).....	86
Tabelle 17: Ausgangskonzentrationen der Reagenzien für die Real Time PCR.....	95

Tabelle 18: Pipettierschema für die Optimierung der Primerkonzentrationen	98
Tabelle 19: Temperaturprogramm für die Primeroptimierung	98
Tabelle 20: Pipettierschema der Kreuzreaktivitätstests für die einzelnen Primerpaare	99
Tabelle 21: Temperaturprogramm für die Kreuzreaktivitätstests.....	99
Tabelle 22: Pipettierschema der TaqMan®-Sondenoptimierung für Primerpaar 2	101
Tabelle 23: Temperaturprogramm für die TaqMan®-Sondenoptimierung	101
Tabelle 24: Pipettierschema für die Kreuzreaktivitätstests mit dem TaqMan®-Assay	102
Tabelle 25 a und b: Pipettierschema und Temperaturprogramm des Duplex-Assays	103
Tabelle 26: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Sesam-Primerkonzentrationen	105
Tabelle 27: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Erdnuss-Primerkonzentrationen	105
Tabelle 28: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Sesam-Sondenkonzentration	106
Tabelle 29: Pipettierschema für die Duplex-Assay-Optimierung durch Variation der Erdnuss-Sondenkonzentration	107

8.4. Literaturverzeichnis

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004), *Molekularbiologie der Zelle*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 543-594
- Asero, R.; Ballmer-Weber, B. K.; Beyer, K.; Conti, A.; Dubakiene, R.; Fernandez-Rivas, M.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Lidholm, J.; Mustakov, T.; Oude Elberink, J. N. G.; Pumphrey, R. S. H.; Stahl Skov, P.; van Ree, R.; Vlieg-Boerstra, B. J.; Hiller, R.; Hourihane, J. O.; Kowalski, M.; Papadopoulos, N. G.; Wal, J.-M.; Mills, E. N. C.; Vieths, S., (2007), *IgE-Mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives*, Molecular Nutrition & Food Research, 51:135-147
- Besler, M. (2001), *Determination of allergens in food*, Trends in Analytical Chemistry, 20 (11):662-672
- Beyer, K.; Grishina, G.; Bardina, L.; Sampson, H. A. (2007), *Letters to the Editor*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 119 (6):1554-1556
- BioRad Laboratories, (2006), Real-Time PCR Applications Guide
- Bredehorst, R.; David, K. (2001), *What establishes a protein as an allergen?*, Journal of Chromatography B, 756:33-40
- Brown, T. (2002), *Gentechnologie für Einsteiger*, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 3:199-214
- Brzezinski, J. L. (2007), *Detection of sesame seed DNA in food using real-time PCR*, Journal of Food Protection, 70 (4):1033-1036
- Burks, W.; Ballmer-Weber, B. K. (2006), *Food allergy*, Molecular Nutrition & Food Research, 50:595-603
- Dalal, I.; Binson, I.; Reifen, R.; Amitai, Z.; Shohat, T.; Rahmani, S.; Levine, A.; Ballin, A.; Somekh, E., (2002), *Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel*, Allergy, 57:362-365

European Food Safety Authority (2004), *Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes*, The EFSA Journal (Request Nr. EFSA-Q-2003-016), 32:1-197

Hird, H.; Lloyd, J.; Goodier, R.; Brown, J.; Reece, P. (2003) *Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction*, European Food Research and Technology, 217:265-268

Holzhauser, T.; Stephan, O.; Vieths, S. (2006), *Polymerase chain reaction (PCR) methods*, In *Detecting allergens in foods*, Woodhead Publishing limited, Cambridge, England, 125-141

Informall database (18. 10 2006), *Informall database - Communicating about food allergies*, abgerufen am 22. 06 2009 von http://foodallergens.ifr.ac.uk/food.lasso?selected_food=38

Krska, R.; Welzig, E.; Baumgartner, S. (2004), *Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378:63-65

Leduc, V.; Moneret-Vautrin, D. A.; Tzen, J. T.; Morisset, M.; Guerin, L.; Kanny, G. (2006), *Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic*, Allergy, 61:349-356

Lichtenstein, L. M. (2001), *Allergie und Immunsystem*, Spektrum der Wissenschaft Spezial - Das Immunsystem, 2:70-79

Lieberei, R.; Reisdorff, C. (2007), *Nutzpflanzenkunde*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 7:130, 140-142, 146-147

Maleki, S. J. (2004), *Food procesing: effects on allergenicity*, Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 4:241-245

Müller, H. J. (2001), *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1-12, 57-73

- Müllhardt, C. (2006), *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Elsevier, München, 5:53-55, 80-110
- Ortolani, C.; Pastorello, E. A. (2006) *Food allergies and food intolerances*, Best Practice & Research, 20 (3):467-483
- Otto, M. (2000), *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 260-279
- Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E. (2004), *Methods for allergen analysis in food: a review*. Food Additives and Contaminants, 21 (1):1-31
- Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und Rates vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür, L109/29-42
- Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten, 308/15-18
- Richtlinie 2007/68/EG der Kommission 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten, L310/11-14
- Ring, J.; Brockow, K.; Behrendt, H. (2001), *Adverse reactions to foods*, Journal of Chromatography B, 756:3-10
- Sathe, S. K.; Teuber, S. S.; Roux, K. H. (2005), *Effects of food processing on the stability of food allergens*, Biotechnical Advances, 23:423-429
- Saunders, G. C. (1999), *DNA extraction*, In G. C. Saunders, & H. C. Parks, *Analytical molecular biology: quality and validation*, Royal Society of Chemistry, Great Britain, 32:29-46
- Scaravelli, E.; Brohée, M.; Marchelli, R.; van Hengel, A. J. (2008), *Development of three Real-Time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products*, European Food Research and Technology, 227:857-869

Schöringhumer, K.; Cichna-Markl, M. (2007), *Development of a real time PCR method to detect potentially allergenic sesame (Sesamum indicum) in food*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:10540-10547

Schöringhumer, K.; Redl, G.; Cichna-Markl, M. (2009), *Development and validation of a duplex real time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food*, Journal of Agricultural and Food chemistry, 57:2126-2134

Stephan, O.; Vieths, S. (2004), *Development of a real-time PCR and a sandwich-ELISA for the detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (Arachis hypogaea) in processed food*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:3754-3760

Untersmayer, E.; Jensen-Jarolim, E. (2006), *Mechanisms of type I food allergy*, Pharmacology & Therapeutics, 112:787-798

9. CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sabrina Niedermayer

Geburtsdatum: 25.06.1984

Geburtsort: Wien

Eltern: Johann und Brigitta Niedermayer

AUSBILDUNG

1990-1994 Volksschule der Schulbrüder, 1150 Wien

1994-2003 Neusprachliches Gymnasium G3, 1030 Wien

Juni 2003 Matura

Seit Oktober 2003 Studium der Chemie an d. Universität Wien

März 2007 Abschluss des 1. Studienabschnittes

Oktober 2008 Beginn der Diplomarbeit „*Entwicklung einer Duplex-Real Time PCR-Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Sesam und Erdnuss in Lebensmitteln*“ unter der Betreuung von Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

Sommer 2008 MAPAG (Baustoffuntersuchungen & Umweltanalytik),
Ferialpraktikantin im Umweltlabor

SS 2009 Institut für Analytische Chemie und
Lebensmittelchemie, Tutorin im
Lebensmittelchemischen Praktikum A (für Chemiker)

und Lebensmittelanalytisches Praktikum (für
Ernährungswissenschaftler)

Sommer 2009 MAPAG (Baustoffuntersuchungen & Umweltanalytik),
Ferialpraktikantin im Umweltlabor

Seit Oktober 2009 MAPAG (Baustoffuntersuchungen & Umweltanalytik),
Technikerin im Umweltlabor

TEILNAHME AN KONGRESSSEN

24.-27. August 2009 13. Österreichischen Chemietage der GÖCH,
Präsentation: "*Development of a Duplex Real-
Time PCR Method to Simultaneously Detect
Potentially Allergenic Sesame and Peanut in
Food*"